

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

**EFFECTO DE CLOPROSTENOL Y AGLEPRISTONE SOBRE LA GESTACIÓN
TEMPRANA Y MEDIA EN FELINOS. ESTUDIOS CLÍNICOS,
ENDOCRINOLÓGICOS Y ULTRASONOGRÁFICOS**

**Autor: MV, García Mitacek María Carla
Director: MV, DrCVet, Williams Sara Inés
Codirector: MV, DrCVet, Stornelli María Alejandra**

**Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata.**

Miembros Titulares del Jurado:

**MV, DCVet, Castillo Victor
Dr, Goya Rodolfo Gustavo
MV, DCVet, Mestorino Nora**

La Plata, Buenos Aires, 19 de Septiembre de 2013

DEDICATORIA

A mi madre Betty

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle muy especialmente a mi directora de tesis la Dra. Sara Inés Williams y también a mi codirectora de tesis la Dra. María Alejandra Stornelli, quienes confiaron en mí, y me brindaron toda su capacidad y experiencia científica. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que me permitieron crecer tanto a nivel científico como personal. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo de tesis realizado.

De igual modo, quiero agradecer especialmente a todos los que trabajan en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal, por su compañerismo y haber participado directa o indirectamente en mi tesis, ya sea leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. A todos los integrantes del grupo de trabajo de pequeños animales: Candela Bonaura, Cecilia Stornelli, Claudia Titarelli y Romina Nuñez Favre. A mi becaria alumna Romina Praderio que colaboró en la realización de gran parte de los experimentos. A Denisse Mansilla Hermann, Magdalena Etchepare, Isaias Mayorana y Martín Vicente por su colaboración en mi trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. Rodolfo Goya y a Yolanda Elena Sosa por su continua colaboración en las determinaciones hormonales por RIA.

Al Dr. Juan José Gagliardino y Adrián Díaz del CENEXA- UNLP por su colaboración en las determinaciones hormonales por RIA.

Al Dr. Mauricio Giuliadori por su contribución con el análisis estadístico.

A Royal Canin por la colaboración con alimento Fit 32[®] para la alimentación de los animales incluidos en el estudio.

A InMed SRL por proveer el ecógrafo para realizar los seguimientos ultrasonográficos durante los experimentos.

A Dr. Enzo Landoni por estar siempre a mi lado, por sus sabias palabras y consejos.

A mi mamá, a mis hermanas Silvina y Virginia, y a mis cuñados, por su apoyo continuo e incondicional.

A mi sobrino Pascual quien con su alegría, sonrisas y amor me llena de felicidad día a día.

Agradezco a la UNLP por haberme permitido realizar mis estudios de grado y postgrado.

Agradezco a la CIC y CONICET por haberme becado para poder dedicarme a realizar la tesis.

A los jurados por sus aportes y correcciones.

ÍNDICE

	PÁGINA
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE PUBLICACIONES.....	XVI
RESUMEN	XIX
SUMMARY	XX
CAPÍTULOS	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
Introducción.....	01
Ciclo estral.....	02
Gestación	06
Diagnóstico de gestación.....	09
Pérdida de la gestación	15
Interrupción de la gestación.....	17
Agonistas dopaminérgicos.....	17
Prostaglandinas.....	18
Protocolos combinados de agonistas dopaminérgicos y prostaglandinas	19
Antiprogestágenos	20

II. VARIACIONES ULTRASONOGRÁFICAS Y ENDOCRINOLÓGICAS EN LA GESTACIÓN FELINA

Introducción.....	25
Materiales y Métodos	30
Animales.....	30
Criterios de inclusión.....	30
Marco bioético del uso de animales	31
Diseño experimental.....	31
Detección del estadio del ciclo estral	34
Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico	34
Examen ultrasonográfico	35
Análisis estadístico	35
Resultados.....	36
Discusión	42
Conclusiones.....	46

III. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FARMACOLÓGICA DEL CLOPROSTENOL Y AGLEPRISTONE PARA INTERRUPIR LA GESTACIÓN TEMPRANA EN FELINOS

Introducción.....	48
Materiales y Métodos	54
Animales.....	54
Criterios de inclusión.....	55
Marco bioético del uso de animales	55
Diseño experimental.....	55

Detección del estadio del ciclo estral	61
Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico	61
Examen ultrasonográfico	61
Análisis estadístico	61
Resultados.....	62
Discusión	70
Conclusiones.....	77

IV. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FARMACOLÓGICA DEL CLOPROSTENOL Y AGLEPRISTONE PARA INTERRUPIR LA GESTACIÓN MEDIA EN FELINOS

Introducción.....	78
Materiales y Métodos	86
Animales.....	86
Criterios de inclusión.....	87
Marco bioético del uso de animales	87
Diseño experimental.....	87
Detección del estadio del ciclo estral	91
Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico	91
Examen ultrasonográfico	91
Análisis estadístico	91
Resultados.....	92
Discusión	99
Conclusiones.....	104

V. CONCLUSIONES GENERALES	106
VI. BIBLIOGRAFÍA	108
VII. APÉNDICE I	114
VIII. BIOGRAFÍA PERSONAL	116

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC Área bajo la curva

ALI Aglepristone

ATP Anteroposterior

CAB Cabergolina

CLO Cloprostenol

CL Cuerpo lúteo

d días

DB Diámetro biparietal

DG Día de gestación

DPP Día previo al parto

DSG Diámetro del Saco Gestacional

DT Diámetro transversal abdominal

E₂ Estrógenos

EG Edad gestacional

ES Error Estándar

FCF Frecuencia Cardíaca Fetal

h Hora

FSH Hormona folículo estimulante

GnRH Hormona liberadora de gonadotropina

LH Hormona luteinizante

im Intramuscular

kg Kilogramos

LCC Longitud cráneo-caudal

LON Longitudinal

MHz Megahertz

MEL	Melatonina
μg	Microgramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MCF	Movimientos Corporales Fetales
ng	Nanogramos
PBF	Perfil Biofísico Fetal
PCSG	Partículas en la Cavidad del Saco Gestacional
PG	Prostaglandina
pg	Picogramos
PLA	Placebo
P ₄	Progesterona
PRL	Prolactina
RCSG	Reducción de la Cavidad del Saco Gestacional
RIA	Radioinmunoanálisis
SG	Saco Gestacional
sc	Subcutáneo
TRV	Transversal
TRT	Tratamiento
VSG	Volumen del Saco Gestacional
W	Watts

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
2.1. Fotos e imágenes ultrasonográficas de fetos de 40 d de gestación en la gata. Transductor lineal 7,5 MHz.....	33
2.2. Análisis de regresión múltiple de los parámetros evaluados durante el seguimiento ultrasonográfico	36
2.3. Análisis de regresión múltiple de las concentraciones de P ₄ durante la gestación y DPP.....	41
2.4. Coeficiente de correlación de Pearson y probabilidad de los parámetros ultrasonográficos y endocrinológicos estudiados durante el periodo de 21 a 63 días de gestación	41
3.1. Cambios ecográficos observados en el SG mediante la confección de una escala ad hoc de las partículas de la cavidad del saco gestacional.....	59
3.2. Cambios ecográficos observados en el SG mediante la confección de una escala ad hoc de la reducción de la cavidad del saco gestacional.....	60
4.1. Sistema de puntuación del perfil biofísico fetal	90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Embriogénesis en la gata doméstica. Diagrama del desarrollo embrionario in vivo en la gata doméstica luego de servicio natural a los 2 y 3 d del estro..	7
1.2. Imágenes ultrasonográficas de un feto: Corte Transversal. La línea indica los planos utilizados para medir, DB (A), DT (B). Imagen ultrasonográfica del: DB (A), DT (B) de un feto de 22 d pre-parto.....	12
1.3. Medición de la vesícula embrionaria en una ecografía transvaginal de la mujer. Las dimensiones ATP y LON de la vesícula se determinan en una imagen longitudinal que atraviesa el útero. La dimensión TRV de la vesícula se mide en una imagen transversal del útero	13
2.1. Media \pm ES de concentración de P_4 durante el estro, gestación (intervalo 1-54 d), y el intervalo parto (desde el día 9 antes del parto hasta el día 1 después del parto)	28
2.2. Diseño experimental para el estudio de la gestación en la gata doméstica	32
2.3. Imágenes del SG: A, B, C: Ilustración de las mediciones de los diámetros del SG LON y TRV del útero grávido durante las ecografías. D, E: Imagen ultrasonográfica del SG de 21 d de gestación en la gata. Corte LON: calibre 1 (LON), calibre 2 (ATP). Corte TRV: calibre 1 (TRV), calibre 2 (pared del SG). Transductor lineal 7,5 MHz.....	32
2.4. Análisis de regresión múltiple entre las dimensiones LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG y los DG utilizando un modelo polinomial.....	37
2.5. Análisis de regresión múltiple entre el VSG (mm ³ , A), el DSG (mm, B) y la pared del SG (mm, C) y los DG utilizando un modelo polinomial.....	38

2.6. Análisis de regresión múltiple entre la LCC (mm, A), el DB (mm, B) y el DT (mm, C) y los DG utilizando un modelo polinomial.....	39
2.7. Cuadrados medios mínimos y ES de P_4 (ng/mL) desde el día 21 al 63 de gestación.....	40
2.8. Cuadrados medios mínimos y ES de P_4 (ng/mL) desde el día 1 al 14 previo al parto.....	41
3.1. Estructura química de la P_4 y el ALI, y mecanismo de acción del ALI. El ALI se une a receptores de la P_4 , evitando la acción de la P_4 endógena e interrumpiendo la transmisión del mensaje endocrino que permite el mantenimiento de la gestación.	52
3.2. Diseño experimental para el estudio de la interrupción de la gestación de gatas mediante la administración de PLA (1 mL de solución fisiológica sc), CLO ($5\mu\text{g/kg}$, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación	56
3.3. Mediciones de los diámetros del SG LON y TRV del útero grávido durante las ecografías.....	58
3.4. Cuadrados medios mínimos y ES de las dimensiones: LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG durante el TRT con PLA, CLO ($5\mu\text{g/kg}$, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación.....	65
3.5. Cuadrados medios mínimos y ES del VSG (mm^3 , A) DSG (mm, B) pared del SG (mm) durante el TRT con PLA, CLO ($5\mu\text{g/kg}$, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación....	66

3.6. Cuadrados medios mínimos y ES de PCSG (A) y RCSG (B) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación.....	67
3.7. Cuadrados medios mínimos y ES de P ₄ (ng/mL) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación.	68
4.1. Diseño experimental para el estudio de la interrupción de la gestación de gatas mediante la administración de PLA (1 mL de solución fisiológica sc), CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación	88
4.2. Cuadrados medios mínimos y ES de las dimensiones: LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación.	94
4.3. Cuadrados medios mínimos y ES del VSG (mm ³ , A) DSG (mm, B) pared del SG (mm, C) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación....	95
4.4. Cuadrados medios mínimos y ES del LCC (mm, A), DB (mm, B), DT (mm, C) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación.....	96
4.5. Cuadrados medios mínimos y ES de P ₄ (ng/mL) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación.	98

LISTA DE PUBLICACIONES

Trabajos en revistas con referato

1. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, Williams SI, de la Sota RL, Stornelli MA. Interrupción de la gestación en la gata doméstica: Actualización bibliográfica. *Analecta Veterinaria*, 2012, 32 (1):50-56.
2. García Mitacek MC, Stornelli MC, Praderio R, Stornelli MA, de la Sota RL. Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 21-22 and 35-38 days of gestation for pregnancy termination in queens. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47 (6): 200-203.
3. García Mitacek MC, Praderio RG, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Relación entre parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata doméstica. *Analecta Veterinaria*, 2013, 32 (2):5-10.

Resúmenes en congresos nacionales e internacionales

1. García Mitacek MC, Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Bonaura MC, Nuñez Favre R, de la Sota RL. Early pregnancy termination by aglepristone in queens. Annual Conference & Symposium, Society for Theriogenology. 31 de Agosto al 5 de Septiembre de 2010. pp. 358.
2. García Mitacek MC, Stornelli MC, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Variaciones ultrasonográficas del saco gestacional en gatas tratadas con aglepristone. XIX Jornadas Veterinaria en Pequeños Animales, Jornadas de Intermédica. Buenos Aires. 25y 26 de Abril de 2010.
3. García Mitacek MC, Mansilla Hermann D, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA.

- Interrupción temprana de la gestación en la gata doméstica (*Felis catus*). XI Jornadas de divulgación técnico científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR. 6 de Agosto de 2010. pp. 131-132.
4. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. Evaluación de la fertilidad en gatas previamente tratadas con aglepristone. XII Jornadas de divulgación técnico científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL – UNR. 16 de Septiembre de 2011. pp. 187-188.
 5. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Rojas Samora CA, Stornelli MA. Relación entre parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata. Primer Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Viña del Mar. Chile. 7 y 8 de Noviembre de 2011.
 6. García Mitacek MC, Stornelli MC, Bonaura MC, Praderio R, Stornelli MA, de la Sota RL. Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 21-22 d of gestation for pregnancy termination in queens. VII International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler British Columbia, Canada. 26 al 29 de Julio de 2012. pp. 81-82
 7. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, Bonaura MC, Stornelli MA, de la Sota RL. Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 35-38 d of gestation for pregnancy termination in queens. VII International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler British Columbia, Canada. 26 al 29 de Julio de 2012. pp. 83-84.
 8. García Mitacek MC, Stornelli MC, Bonaura MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. Variaciones de los parámetros ultrasonográficos como indicadores

- de interrupción de la gestación media en gatas. XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2012 Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL. Segunda Reunión Conjunta UNL – UNR. 6 de Agosto de 2012. pp. 137-138.
9. García Mitacek MC, Stornelli MC, Bonaura MC, Silvestrini MP, de la Sota RL, Stornelli MA. Efecto de cloprostenol sobre la gestación temprana en felinos. Estudios clínicos y ultrasonográficos. XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Cartagena de Indias, Colombia. 24 al 27 de Octubre de 2012.
10. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Evaluación de la fertilidad posaborto en gatas tratadas con cloprostenol. Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Buenos Aires. 15 y 16 de noviembre de 2012.

TÍTULO Efecto de cloprostenol y aglepristone sobre la gestación temprana y media en felinos. Estudios clínicos, endocrinológicos y ultrasonográficos.

PALABRAS CLAVES Gata, gestación, interrupción de la gestación

RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivos 1) relacionar diferentes parámetros ultrasonográficos con el DG y evaluar las fluctuaciones séricas de P_4 durante la gestación en la gata doméstica; 2) evaluar el efecto farmacológico del ALI y CLO para interrumpir la gestación temprana y media en felinos; 3) estudiar los cambios ultrasonográficos durante el TRT; 4) evaluar la fertilidad postratamiento. Para cumplir con estos objetivos se realizaron tres experimentos. En el experimento uno se realizó un seguimiento ultrasonográfico y endocrinológico desde el día 21 de gestación hasta el parto. Todas las gatas llegaron al final de la gestación. Pudo visualizarse una correlación positiva entre los registros ultrasonográficos de las mediciones realizadas a los SG y fetos con los DG. Así mismo se obtuvo una correlación positiva entre la concentración sérica de P_4 , los DG y los DPP. La mayoría de los parámetros ultrasonográficos fueron explicados por la función polinómica con $r^2 > 0.70$. En el experimento dos y tres se evaluó el efecto del ALI y CLO entre 21-22 y 35-38 días de gestación, respectivamente. El ALI resultó ser efectivo para interrumpir la gestación temprana y media sin la ocurrencia de efectos colaterales. En contraposición el CLO no resultó efectivo para interrumpir la preñez temprana y media, presentando efectos colaterales de grado leve. Los registros ultrasonográficos de las mediciones realizadas a los SG y fetos permitieron detectar cambios relacionados con interrupción temprana y media de la gestación. Se estudiaron las fluctuaciones de P_4 en relación al TRT, observándose un ascenso postratamiento en las gatas ALI, y un descenso postratamiento en las gatas CLO. Todas las gatas del grupo ALI y CLO retornaron al estro y conservaron la fertilidad. En conclusión, con la determinación de ecuaciones exponenciales hemos correlacionado las mediciones ultrasonográficas y de la concentración sérica de P_4 con los DG. Por lo tanto con este estudio se obtuvieron nuevos datos para el monitoreo de la gestación en la gata desde el día 21 hasta el final de la preñez. Así mismo los protocolos utilizados para interrumpir la gestación mostraron que el CLO no resultó efectivo pero el ALI sí resultó efectivo para interrumpir la preñez en gatas que presentaban entre 21-22 y 35-38 d de gestación no afectando la fertilidad posterior.

TITLE Effect of cloprostenol and aglepristone on feline early and mid-gestation. Clinical, endocrinological and ultrasonographic studies

KEY WORDS Queen, pregnancy, pregnancy interruption

SUMMARY

The objectives of this dissertation were to study: 1) the relationship between different ultrasonographic measurements with gestation age and evaluate the serum P₄ concentration during pregnancy in the queen; 2) the efficacy of ALI and CLO to induce early and mid-pregnancy termination in queens; 3) the study the ultrasonographic changes during ALI and CLO TRT; and 4) to evaluate fertility ALI and CLO posttreatment. Three experiments were carried out to accomplish these objectives. In experiment one, females were daily monitored by ultrasonography since day 21 to the end of pregnancy to recorded gestational sac, fetal measurements and serum P₄ concentration. All queens successfully carried their pregnancies to term. A positive correlation was found between ultrasonographic measurements and gestational age, and between serum P₄ concentration and gestational age and days prior to parturition. Most of the ultrasonographic parameters were explained by polynomial function with $r^2 > 0.70$. In experiment two and three we studied the effect of ALI and CLO at 21-22 and 35-38 days of pregnancy, respectively. ALI was effective at inducing early and mid-pregnancy interruption and no side effects were observed in the animals. Conversely CLO was not effective to induce early and mid-pregnancy interruption and side effects lesser degree was observed. The ultrasonographic measurements gestational sac and fetal showed that was different in all treatment groups and could be used to detect changes with early and mid-pregnancy interruption. When we studied hormonal response in relation with the treatment, we observed that serum P₄ concentration increase posttreatment in ALI group and decrease posttreatment in CLO group. All ALI and CLO queens had a normal return to estrus and had successful pregnancy after treatment. In conclusion, we correlated ultrasonographic measurements and serum P₄ concentration with days of gestation, with the determination of the exponential equations. Therefore, with this study we obtained new data for monitoring pregnancy in the queen since day 21 to the end of pregnancy. In addition the results for this study indicate that CLO is not effective, but ALI is effective to induced pregnancy interruption in queens at 21-22 or 35-38 days of pregnancy.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

La ocurrencia de gestaciones no deseadas es frecuente en hembras felinas. Es así que la interrupción de la gestación constituye un motivo de consulta cotidiano en la clínica reproductiva diaria. Las crías nacidas de estos animales muchas veces terminan como animales callejeros que habitan en terrenos baldíos o casas abandonadas dando origen a nuevos nacimientos y a la formación de poblaciones urbanas de gatos abandonados. Estos animales sufren falta de alimento, atención veterinaria preventiva y curativa así como las inclemencias del ambiente (lluvias, frío, etc.). Así mismo, en regiones con alta densidad de población como Capital Federal, Gran Buenos Aires y La Plata el problema es aún más grave ya que aumentan las probabilidades de accidentes ocurridos con personas que toman contacto con animales callejeros sin controles sanitarios. El control de la reproducción de estos animales es imprescindible ya que las poblaciones de gatos callejeros crecen en forma exponencial con los consecuentes problemas que esto acarrea. La ocurrencia de enfermedades zoonóticas (toxoplasmosis, endo y exoparasitosis, clamidiosis, rabia, etc.) y accidentes (mordeduras y arañazos) relacionadas con este grupo de animales deteriora la calidad de vida de toda la población y en especial la de los pobladores de zonas marginales. Estos últimos son los que más problemas sanitarios padecen a consecuencia de la gran cantidad de animales callejeros sin controles sanitarios que habitan en dichas áreas.

En ocasiones la gata es llevada al veterinario para un examen de rutina con el fin de cumplir con el plan sanitario anual o por algún problema de salud y al ser examinada por el veterinario se descubre una preñez temprana o media. Por lo tanto un motivo de consulta frecuente es el deseo de interrumpir la gestación no deseada en las gatas

mascotas cuando la hembra se encuentra en el primer o segundo tercio de la gestación. Sin embargo, cuando la gata forma parte de un plantel reproductivo se plantea la necesidad de que el protocolo utilizado no afecte la fertilidad posterior de la hembra. Es así que el control de la reproducción en la gata doméstica se presenta como un constante desafío en la clínica reproductiva de pequeños animales.

Con el fin de lograr el control de la reproducción en la gata, resulta de suma importancia conocer las particularidades del ciclo estral felino y la fisiología de la gestación. A su vez la evaluación y seguimiento de la preñez mediante métodos complementarios, permite valorar los cambios fisiológicos y detectar afecciones que pueden ocurrir durante el transcurso de la misma. La comprensión de la fisiología reproductiva de la hembra felina nos permitirá analizar las ventajas y desventajas de las diferentes estrategias terapéuticas disponibles para la interrupción de la gestación. Así mismo nos permitirá estudiar, desarrollar e implementar nuevos protocolos para la interrupción de la gestación no deseada en la gata doméstica.

Ciclo estral

Fisiológicamente, la gata doméstica es poliéstrica estacional, es decir que ciclará de manera repetida durante una estación reproductiva a menos que el ciclo sea interrumpido por preñez, pseudopreñez o enfermedad (Feldman y Nelson, 2000). En nuestro país las gatas presentan celo durante las estaciones de primavera y verano ocurriendo un anestro nestacional en otoño e invierno (Stornelli, 2007), sin embargo bajo un régimen lumínico artificial de 14 h de luz diarias ciclan durante todo el año (Robledo y col., 2003). Por el contrario, si las gatas son expuestas a un régimen lumínico diario corto (8 h luz/diarias), la actividad ovárica cesa y consecuentemente la hembra entra en anestro (Leyva y col., 1989).

La mayoría de las hembras felinas alcanzan la pubertad entre los 6 y 9 meses de edad (Verstegen, 1998; Esteve, 1992). Esto varía debido a la influencia de varios factores, entre ellos la época del año en que la hembra nace. Se ha informado que aquellas hembras que nacen en invierno comienzan su actividad sexual más tempranamente que aquellas que nacen en verano (Tsutsui y col., 2004). Por otro lado, la madurez sexual presenta cierta heredabilidad, es así que razas de pelo corto son más precoces que las razas de pelo largo (Povey, 1978). Otro factor a considerar es el peso, ya que las hembras necesitan un peso mínimo de 2,3 a 2,5 kg para llegar a la pubertad (Verstegen, 2002).

El ciclo estral felino se divide en cuatro períodos; proestro, estro, interestro y anestro (Johnston y col., 2001). El proestro, es el período del ciclo estral cuya duración puede ser tan breve (24 h) que pasa inadvertido o durar 1 a 2 d (Johnson, 2000). Es el momento de actividad folicular (síntesis y secreción de E_2), cambios en la citología vaginal y preparación para el apareamiento y preñez (Feldman y Nelson, 2000). Los folículos ováricos desarrollan desde un diámetro aproximado de 0.5 mm a 1.5 mm durante este período (Esteve, 1992). Los E_2 , llegan a concentraciones superiores a 20 pg/mL, siendo los niveles plasmáticos de esta hormona en anestro o interestro inferiores a 15 pg/mL (Feldman y Nelson, 2000). El aumento de las concentraciones séricas de E_2 se relaciona con el comportamiento afectuoso de la hembra, y las características conductuales (fricciones, pisoteo con los miembros posteriores, vocalizaciones y menor hostilidad hacia el macho) presentes en esta etapa del ciclo estral. En este período si bien la hembra atrae al macho, no permite la monta (Johnson, 2000).

El estro es el momento en que la hembra acepta el servicio, y la síntesis y concentración sérica de E_2 llega a los niveles más altos, 40 a 80 pg/mL (Verstegen, 2002). La duración promedio de este período es de 6 a 10 d (Esteve, 1992). Debido a las

altas concentraciones de E_2 plasmático, la gata aumenta las vocalizaciones, presenta lordosis, mantiene la cola hacia un lado y acepta la cópula (Johnson, 2000). Este aumento de los E_2 , no sólo produce un cambio del comportamiento, sino que también actúa sobre el epitelio vaginal produciendo la cornificación del mismo (Johnston y col., 2001). En consecuencia, la citología vaginal de la fase folicular (proestro y estro) presenta células superficiales nucleadas y anucleadas. Las células superficiales son grandes, de bordes irregulares, núcleo oval y picnótico o sin núcleo (Esteve, 1992).

Una particularidad de las hembras felinas es que la ovulación es inducida, donde la estimulación vaginal producida por el pene del macho es seguida en forma inmediata por un incremento en la actividad neural dentro de las áreas hipotalámicas (Verstegen, 2002). La mencionada estimulación causa liberación de GnRH, con la consecuente onda de LH que sigue a la estimulación vaginal. Las ondas de LH se presentan a los 15 minutos de la cópula. Los niveles máximos de LH requieren entre 8 a 12 cópulas y se alcanzan 4 h después de ocurrido el primer coito. La ovulación ocurre aproximadamente a las 24 h después de la rápida liberación de LH (Felman y Nelson, 2000). Los valores de esta hormona van desde 10 ng/mL antes del apareamiento a más de 100 ng/mL después de la estimulación máxima (Verstegen, 2002). Algunas gatas pueden no liberar adecuadas concentraciones de LH para inducir la ovulación a pesar de repetidas cópulas con machos fértiles (Johnson, 2000). La adecuada secreción de LH postestimulación vaginal no siempre inducirá la ovulación. Es probable que una cierta madurez intrínseca del folículo en desarrollo sea prerequisite para que el estímulo coital que permite la ovulación sea efectivo (Johnson, 2000).

Se ha observado que un 35 % de las hembras felinas pueden presentar ovulación espontánea (Johnson, 2000). Esto ocurre en aquellas colonias de gatos en que las hembras están confinadas en el mismo ambiente que los machos, a pesar de que no haya

contacto físico ni visual. Esta observación se puede atribuir al efecto de las feromonas tal como ocurre en otras especies (Verstegen, 1998).

En ausencia de apareamiento u ovulación espontánea comienza la etapa llamada interestro, la cual es definida como la etapa que le sigue a un estro y precede al estro siguiente. La duración de este período varía de 8 a 10 d promedio (Feldman y Nelson, 2000). Mediante citología vaginal puede observarse un predominio de células intermedias, células superficiales en menor proporción y ocasionalmente pueden visualizarse neutrófilos. Las células intermedias son más pequeñas que las células superficiales, con contornos celulares regulares y núcleo redondo u oval, el cual puede estar picnótico (Esteve, 1992).

Si ocurre ovulación pero los ovocitos no son fertilizados, los folículos se luteinizan y se forman CL que secretan P_4 . La fase luteal es más corta que la gestación, y se denomina pseudogestación (Verstegen, 1998). En esta etapa, la concentración de P_4 sérica llega a niveles de más de 20 ng/mL (Wildt y col., 1980; Schmidt y col., 1983). Sin embargo, la concentración de P_4 comienza a descender alrededor del día 25 llegando a valores basales entre los 30 y 40 d, por lo tanto los CL de la pseudopreñez estarían pre-programados a sufrir atrofia después de los 25-35 d al no existir un soporte luteotrófico proveniente del embrión o placenta (Verstegen, 1998). Al final de la pseudogestación existe un período breve de interestro que precede al siguiente estro, siempre y cuando las gatas estén en etapa reproductiva (Verstegen, 1998). En consecuencia la duración del período de pseudogestación es aproximadamente de 40 d (Wildt y col., 1980; Schmidt y col., 1983). En esta fase la citología vaginal presenta las mismas características que la citología de interestro.

El anestro es el período caracterizado por la ausencia de ciclos estrales. Esta fase ocurre cuando disminuyen las horas luz con el consiguiente aumento de MEL y PRL

(Banks y Stabenfeldt, 1983). Las concentraciones séricas de MEL y PRL son sincrónicas, se elevan durante los períodos de oscuridad y disminuyen durante los períodos de gran intensidad lumínica (Leyva, 1989). Por lo tanto, el anestro felino se caracteriza por niveles elevados de MEL y PRL, y niveles basales de E_2 y P_4 (Verstegen, 1998). En esta etapa, la citología vaginal presenta contenido mucoso, predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias y leucocitos (Colby, 1980). Las células parabasales se caracterizan por ser redondas, con bordes celulares regulares y poseer una relación núcleo-citoplasma disminuida (Esteve, 1992).

Gestación

Después de la ovulación, los óvulos permanecen en los oviductos durante 5 a 6 d, lugar donde ocurre la fertilización (Feldman y Nelson, 2000). Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse mientras recorre el oviducto hacia el útero. Entre las 60 a 68 h de la cópula se observan embriones de 1 a 2 células, 76 h más tarde se observan embriones de 5 a 8 células y a las 100 h los embriones poseen entre 9 y 16 células. A las 124 h se observan mórulas en nivel del oviducto las cuales a las 148 h se compactan observándose blastocistos tempranos que atraviesan la unión uterotubárica, ubicándose en el cuerno uterino (Knospe, 2002; Swanson y col., 1994; Figura 1.1.). Las divisiones continúan y comienza la producción de líquido que dará a lugar a la formación de una cavidad o blastocelo en el interior de la masa de células. Esta etapa en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la zona pelúcida, recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian según su posición dos poblaciones de células, una el nódulo embrionario que da origen al embrión propiamente dicho, y otra la situada periféricamente que origina el trofoblasto, el cual interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y que formará posteriormente el corion. Luego se produce la ruptura de la

zona pelúcida y la salida del embrión por el punto de rotura. Entre las causas de rotura se encuentran el crecimiento y expansión del blastocisto y el aumento de líquido en el blastocele. El blastocisto eclosionado, que se ha desprendido de la zona pelúcida, comienza una fase de alargamiento de rápido crecimiento, pasando de una forma esférica a una tubular o filamentosa. Los embriones se mueven en el útero en busca de un lugar adecuado para implantarse (García Sacristan y col., 1995). Se considera que la implantación ocurre entre los 12 a 13 d posteriores a la ovulación (Johnston y col., 2001). El pasaje de embrión a feto ocurre alrededor de los 28 d (Illanes y col., 2007). La duración de la gestación oscila entre 52 y 74 d después del servicio con un promedio de 66 d (Jemmett y Evans 1977; Munday y Davidson, 1993, Prescott, 1973; Rott y col., 1995).

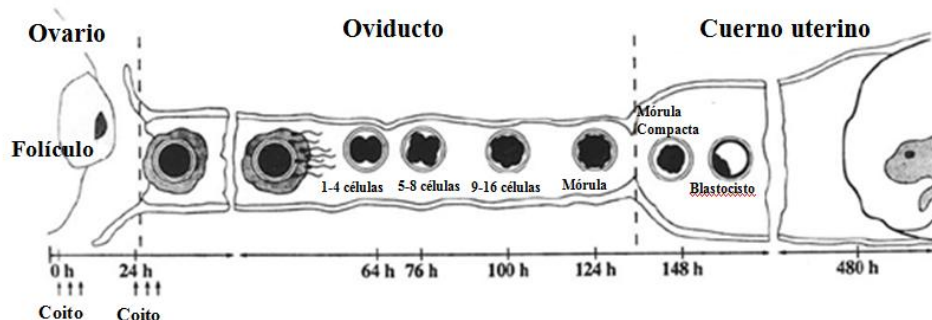


Figura 1.1. Embriogénesis en la gata doméstica. Diagrama del desarrollo embrionario *in vivo* en la gata doméstica luego de servicio natural a los 2 y 3 d del estro (adaptado de Swanson y col., 1994).

Uno a dos días postovulación la concentración de P_4 plasmática aumenta por encima de la concentración basal (< 1 ng/mL) siendo de 2 ng/mL. La P_4 continúa aumentando siendo la concentración de 15 a 30 ng/mL entre los 25 y 30 d de gestación (Johnston y col., 2001). Ésta hormona mantiene valores estables hasta aproximadamente el día 60, momento en que la concentración de P_4 disminuye abruptamente,

coincidiendo con el día del parto (Verstegen, 1998). La elevada progesteronemia durante este período es un reflejo de la función lútea continua así como de la P_4 sintetizada y secretada por la placenta. El CL produce P_4 durante un mínimo de 40 a 50 d, pero las cantidades elaboradas después del día 49 son escasas. A partir del día 50 la P_4 placentaria sería capaz de mantener la gestación (Feldman y Nelson, 2000). Recientemente Siemieniuch y col. (2012) comunicaron que la placenta es una fuente adicional de P_4 en las gatas preñadas. En dicho estudio pudieron determinar que la concentración de P_4 placentaria es baja durante la gestación temprana, incrementándose la concentración de dicha hormona a la largo de la misma. Estos resultados muestran que la placenta podría ser considerada un importante órgano endocrino para el mantenimiento la preñez en las gatas (Siemieniuch y col., 2012).

Durante la fase folicular, la estrogenemia se incrementa con rapidez, permanece elevada por 3 a 4 d y de manera brusca comienza a decaer. Durante los primeros 5 d después de la cópula se reduce a niveles basales (8 a 12 pg/mL), manteniendo estos valores hasta el día 58 y 62 de la gestación, momento en el cual se produce un leve incremento, llegando a niveles de 20 a 30 pg/mL, para comenzar a descender justo antes del parto (Feldman y Nelson, 2000; Johnston y col., 2001).

Las altas concentraciones de E_2 y P_4 , en general, inhiben la producción de gonadotrofinas hipofisarias, por lo que los niveles de FSH y LH son muy bajos durante la gestación (García Sacristan y col., 1995).

La relaxina es una hormona peptídica la cual es producida por la unidad fetoplacentaria. La misma es detectada a partir del día 25 de gestación, y comienza a declinar 10 a 15 d previo al parto. La concentración de relaxina no es detectada en el suero durante el estro, pseudopreñez y dos días post parto, por lo cual permitiría realizar el diagnóstico de gestación en la gata (Feldman y Nelson, 2000). Sin embargo no se

encuentran disponibles en el mercado nacional. Ésta hormona actúa en sinergismo con la P_4 para el mantenimiento de la gestación, previniendo las contracciones espontáneas del útero (García Sacristan y col., 1995).

La PRL es luteotrófica y ayuda al mantenimiento del CL después del día 15 de gestación. El incremento de los niveles de PRL en suero se observan a partir del día 35 de preñez (Verstegen, 1998).

La preñez en las gatas depende de la actividad lútea (Verstegen y col., 1993). El descenso de las concentraciones de P_4 circulante se relaciona con interrupción de la gestación y aborto. Es así que los protocolos para interrumpir la gestación se basan en la administración de drogas que disminuyan las concentraciones de P_4 circulantes actuando sobre el CL (prostaglandinas) o en el bloqueo de los receptores de P_4 presentes en el útero (antiprogestágenos) (Jackson y Johnston, 1980; Jöchle y col., 1989; Jöchle y Jöchle 1998; Onclin y Verstegen, 1997)

Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación puede realizarse por ultrasonografía, palpación abdominal, estudios hormonales y estudios radiográficos. La utilización de cada uno de ellos dependerá del momento de la gestación en el cual se realizará el diagnóstico o control de la preñez en la gata, así como también de los medios con los que se cuentan para tal fin (Feldman y Nelson, 2000).

La ultrasonografía transabdominal ha sido utilizada para detectar gestación tan pronto como 18 d después del servicio. El primer signo que confirma la preñez es la detección de un SG. El SG es anecoico, mide sólo algunos milímetros de diámetro, contiene líquido coriónico, y está rodeado por una pared hiperecogénica delgada, el

trofoblasto. El tejido uterino que rodea el SG se vuelve más grueso localmente y es hiperecogénico en relación al tejido uterino adyacente (Nyland y Mattoon, 2002).

Entre los 23 y 25 d de gestación, el embrión se observa como una estructura ecogénica oblonga de varios milímetros de longitud, situado excéntricamente dentro del SG esférico. El SG está rodeado por una delgada capa interna del útero, periférica e hiperecogénica, la placenta en desarrollo. La placenta zonal visible se puede reconocer entre los 27 y 30 d como un engrosamiento focal cilíndrico, haciéndose evidente hacia el día 36. Entre los 25 y 28 d el embrión se aleja de la pared uterina manteniéndose unido a ella por la membrana del saco vitelino. La membrana del saco vitelino se observa como una estructura ecogénica lineal inicialmente con forma de U, cambiando a una estructura tubular entre los 27 y 31 d. Se extiende de polo a polo del SG envolviéndose finalmente sobre sí misma entre los 31 y 35 d. La membrana del saco vitelino aparece como dos líneas paralelas ecogénicas en una sección sagital, redondas en un plano TRV, separadas por líquido anecoico. Al envolverse, la luz se oblitera y se vuelve hiperecogénica (Nyland y Mattoon, 2002).

Mientras que la detección del SG es diagnóstica de gestación, la visualización de la actividad cardíaca y más adelante, de movimiento fetal es indicativa de viabilidad fetal. La actividad cardíaca se detecta entre los 23 y 25 d. Se identifica como un pequeño foco de ecos que palpitan rápidamente dentro del embrión. Esto ocurre antes de que se aprecien las estructuras anatómicas reconocibles macroscópicamente. La frecuencia cardíaca del feto es aproximadamente el doble de la frecuencia materna. El aumento de la frecuencia cardíaca fetal en respuesta al estrés es un signo positivo, que indica vigor fetal. El movimiento fetal se observa a partir de los 33 y 35 d de gestación (Nyland y Mattoon, 2002).

El desarrollo fetal progresa rápidamente a partir del día 30, pudiendo reconocerse la organogénesis. La orientación fetal se puede reconocer en forma precisa, con la observación de la cabeza y el cuerpo hacia el día 28. Dentro de la cabeza hay un foco inicial anecoico, seguido por el desarrollo, durante la siguiente semana, del plexo coroideo ecogénico bilobulado, rodeando por un ventrículo cerebral anecoico. Los esbozos de las extremidades y el movimiento fetal se reconocen hacia el día 35. El esqueleto fetal se puede identificar entre los 33 y 39 d observándose como una estructura hiperecogénica con sombras acústicas. Primero se detecta la cabeza, seguida de una rápida mineralización de la espina dorsal torácica y las costillas, luego la espina dorsal cervical y el esqueleto apendicular. La vejiga urinaria y el estómago son los primeros órganos abdominales que se identifican ecográficamente y aparecen como áreas anecoicas focales entre los 35 y 39 d. Debido a que el estómago y la vejiga urinaria se llenan y se vacían, se pueden observar varios grados de distensión pudiendo cambiar durante el curso de la exploración (Nyland y Mattoon, 2002).

Se ha demostrado que el pulmón cambia de ecogenicidad durante el desarrollo. El pulmón y el hígado son relativamente isoecogénicos cuando se observan inicialmente, sin una definición clara entre ellos. La orientación fetal se determina por la situación del corazón, el estómago y la vejiga. A medida que el feto se desarrolla, entre los 38 y 42 d, los pulmones se vuelven hiperecogénicos con relación al hígado. Los riñones y los ojos se observan entre los 39 y 47 d. Los riñones son hiperecogénicos con pelvis prominentes y anecoicas. Con el tiempo se pueden diferenciar la corteza y la médula renal, y la pelvis se vuelve menos dilatada. El corazón es hipoeecogénico o anecoico, con ecos lineales septados que representan las paredes de las cámaras y válvulas cardíacas. El día 40 pueden visualizarse las cuatro cámaras cardíacas y entre los 57 y 63 d se puede observar el intestino (Nyland y Mattoon, 2002).

La ultrasonografía ha sido utilizada extensamente para el diagnóstico de gestación, sin embargo también puede utilizarse para predecir las fechas de parto, estimar la EG y evaluar el estrés fetal (Nyland y Mattoon, 2002).

A partir de diferentes estudios realizados sobre el control ultrasonográfico de la gestación en la gata se desarrollaron fórmulas sencillas para ser utilizadas en la predicción de la EG (Nyland y Mattoon, 2002). Los valores obtenidos de la medición del DB y DT de los fetos fueron analizados y junto con el conocimiento de la fecha del parto se generó un diagrama de maduración fetal, permitiendo obtener un cálculo preciso de las fechas probables de parto para gatos con fechas de cubrición desconocida (Nyland y Mattoon, 2002; Beck y col., 1990; Figura 1.2.). Posteriormente se demostró una correlación positiva entre las medidas anatómicas y ultrasonográficas del diámetro externo del SG, así como también el largo embrionario-fetal. Este estudio permitió confirmar la exactitud de las mediciones obtenidas mediante ultrasonografía y corroborar una correlación lineal entre las medidas ultrasonográficas y la EG (Zambelli y col., 2002). Más tarde Zambelli y col. (2004) demostraron una regresión lineal entre las mediciones fetales (DB, DT y diámetro del estómago fetal) y la EG, permitiendo relacionar el crecimiento del feto con la EG (Zambelli y col., 2004).

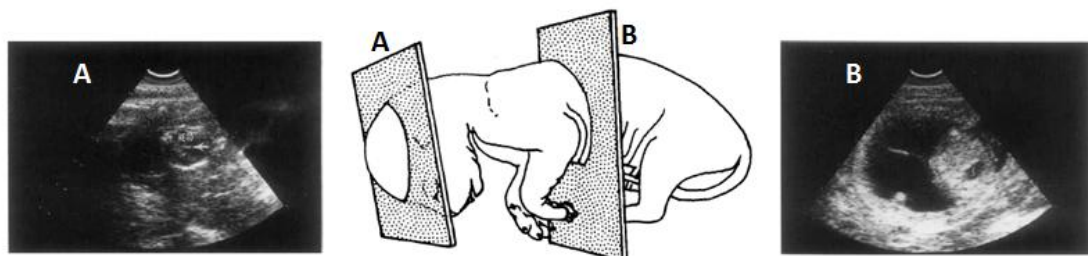


Figura 1.2. Imágenes ultrasonográficas de un feto: Corte Transversal. La línea indica los planos utilizados para medir, DB (A), DT (B). Imagen ultrasonográfica del: DB (A), DT (B) de un feto de 22 d pre-parto (adaptado de Beck y col., 1990).

Otro método utilizado para estimar la EG en mujeres gestantes se basa en la medición del volumen de líquido amniótico del SG calculado a partir de la fórmula de la elipse alargada (Figura 1.3.), este método permite confirmar la EG, coincidiendo con la EG calculada a partir del último período menstrual (Keats y Siström, 2002). Así mismo en humanos el PBF se determina en el momento de realizar la ecografía obstétrica, generalmente junto con la valoración morfológica del embarazo y la medición de parámetros biométricos. El PBF se basa en la evaluación del bienestar de los fetos humanos basándose en los parámetros biofísicos, lo cual se ha convertido en una rutina con el advenimiento de las imágenes ecográficas en tiempo real del feto. Algunos de estos parámetros son los movimientos corporales macroscópicos y respiratorios, el tono fetal, la FCF, el volumen del líquido amniótico y la evaluación de la placenta. La finalidad de realizar el PBF consiste en evaluar el feto y junto con los hallazgos obtenidos poder implementar diferentes alternativas terapéuticas (Keats y Siström, 2002; Manning y col., 1987).

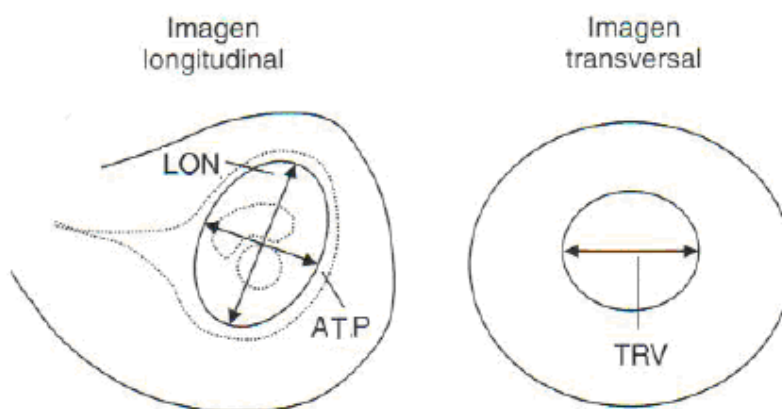


Figura 1.3. Medición de la vesícula embrionaria en una ecografía transvaginal de la mujer. Las dimensiones ATP y LON de la vesícula se determinan en una imagen longitudinal que atraviesa el útero. La dimensión TRV de la vesícula se mide en una imagen transversal del útero (adaptado de Keats y Siström, 2002).

Por lo tanto, la ultrasonografía se utiliza no sólo para el diagnóstico gestacional sino también para la evaluación de la viabilidad embrionaria-fetal. Diversos parámetros tales como la evaluación de la morfología y VSG, movimientos fetales y evaluación de latidos cardíacos permiten estimar la viabilidad embrionaria-fetal y valorar el riesgo de pérdida gestacional (Breukelman y col., 2005; Nyland y Mattoon, 2002; Keats y Siström, 2002; Zambelli y Prati, 2006).

La palpación abdominal puede realizarse entre los 21 y 25 d posteriores al servicio, donde se pueden palpar vesículas gestacionales de forma esférica que miden aproximadamente 2.5 cm de diámetro, siendo fácil el reconocimiento de las mismas. Esta técnica es sencilla, rápida y económica. Si bien es el método más subjetivo para el diagnóstico de gestación, es confiable si el operador está bien entrenado. La facilidad con la cual se puede palpar el abdomen en forma precisa está influenciada por factores como cantidad de grasa corporal, la conformación y el temperamento del paciente. Los factores mencionados tienen mínima influencia sobre la exactitud de los otros métodos de diagnóstico (Nelson y Couto, 2000).

La relaxina es una hormona específica de la gestación y la detección de altas concentraciones séricas podría utilizarse para el diagnóstico de gestación a partir del día 25. Lamentablemente en la actualidad no está disponible en el mercado nacional (Feldman y Nelson, 2000; Nelson y Couto, 2000).

El diagnóstico de la preñez por medio de la radiografía puede realizarse entre los 45 y 50 d de gestación momento en el cual ocurre la mineralización ósea, permitiendo realizar el conteo de los fetos gestados. El tamaño, forma y radio-opacidad del útero varía con el número de fetos y el estadio de la gestación (Johnston y col., 2001).

Pérdida de la gestación

Dependiendo del estadio de la gestación, la pérdida de la preñez puede ser manifestada como muerte embrionaria con reabsorción o aborto de fetos (Johnston y col., 2001). Se define como muerte embrionaria con reabsorción a la ocurrida durante la primera mitad de la gestación (Johnston y col., 2001). Mas tardíamente cuando la muerte fetal ocurre durante la segunda mitad de la preñez, es decir una vez que se completa la organogénesis, ocurre la expulsión de conceptus muertos o incapaces de vivir en forma independiente (aborto) (Johnston y col., 2001; Illanes y col., 2007; Pretzer, 2008).

El diagnóstico de muerte embrionaria o aborto puede llevarse a cabo mediante métodos complementarios como la ultrasonografía o radiografía. La ecografía se utiliza para detectar varias afecciones que pueden producirse durante las gestaciones anormales. Estas incluyen muerte embrionaria, reabsorción fetal, aborto, desarrollo fetal retardado, alteraciones fetales, muerte fetal justo antes o durante el parto y estrés fetal (Nyland y Mattoon, 2002). Los conceptus pequeños o subdesarrollados se reconocen mejor por comparación directa con los conceptus adyacentes. Es difícil realizar una determinación precisa basándose en una medida en un día dado. Sin embargo las exploraciones periódicas permiten documentar el crecimiento normal del DSG (Nyland y Mattoon, 2002). La muerte embrionaria se reconoce por una reducción del tamaño del embrión comparado con los conceptus adyacentes, un cambio en el líquido embrionario de anecoico a hipoecogénico, la presencia de partículas ecogénicas y la ausencia de latido cardíaco. El SG se colapsa y la pared uterina adyacente puede ser relativamente hipoecogénica. Estos cambios suceden rápidamente, en h o hasta algunos días (Nyland y Mattoon, 2002). La muerte fetal después de los 35 d produce un aborto, afectando generalmente, pero no siempre, la camada entera. Los fetos muertos pierden

rápidamente el aspecto ecográfico normal y son expulsados en pocos días. El útero tiene un aspecto similar a un útero postparto (Nyland y Mattoon, 2002). El reconocimiento de la muerte fetal, reconocida por pérdida de la actividad cardíaca, en el período perinatal es de extrema importancia para el veterinario y para el criador. En la evaluación de los fetos casi a término o a término, debe reconocerse inmediatamente la actividad cardíaca. También tendrían que verse movimientos fetales como degluciones, hipos y movimientos del cuerpo y de las extremidades (Nyland y Mattoon, 2002). La posibilidad del reconocimiento ecográfico de las estructuras fetales disminuye rápidamente después de la muerte. Después de un día o dos, sólo se pueden reconocer estructuras esqueléticas mineralizadas por la hiperecogenicidad característica y las sombras acústicas. También se puede identificar aire intrauterino o intrafetal. El diagnóstico de estrés fetal se relaciona con FCF reducida debida a la hipoxia. La FCF normal es aproximadamente el doble de la frecuencia cardíaca materna, siendo la evaluación en modo M un método preciso para determinar la FCF (Nyland y Mattoon, 2002). En las distocias o los partos prolongados, algunos fetos pueden tener frecuencias cardíacas normales mientras que los compañeros de camada están bradicárdicos. Este hallazgo pueden relacionarse con diferentes grados de mortalidad fetal (Nyland y Mattoon, 2002; Feldman y Nelson, 2000).

El estudio radiológico permite mostrar signos indicativos de pérdida gestacional después del día 45, momento en el que ocurre la mineralización ósea. Cambios fetales, tales como colapso o descalcificación del esqueleto, gas intrafetal o una posición fetal anormal, permitirá identificar fetos muertos. Sin embargo las alteraciones radiográficas ocurren luego, de varios días de ocurrida la muerte cuando los fetos han sufrido autólisis. Es así que este método complementario no permite la identificación de fetos muertos inmediatamente luego de ocurrida la muerte a diferencia de la ultrasonografía

abdominal que detecta inmediatamente la ausencia de latidos cardíacos (Feldman y Nelson, 2000).

Interrupción de la gestación

La interrupción de la gestación en la gata doméstica puede realizarse mediante cuatro estrategias terapéuticas que comprenden agonistas dopaminérgicos, PG, combinación de agonistas dopaminérgicos con PG y antiprogestágenos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirá mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros. Conjuntamente la evaluación de la fertilidad postaborto con diferentes protocolos de interrupción de la gestación será de suma importancia en gatas reproductoras. Paralelamente la evaluación de indicadores tempranos de riesgo gestacional resulta de suma importancia para la implementación de estrategias que permitan mejorar el pronóstico en casos de amenaza de aborto. Este último hecho resulta de gran aplicabilidad en la clínica reproductiva diaria.

Agonistas dopaminérgicos

Los agonistas dopaminérgicos inhiben la secreción de PRL al unirse a receptores dopaminérgicos a nivel de la hipófisis. La PRL es el principal factor luteotrófico, por tal motivo el CL se vuelve incapaz de mantener la preñez luego del día 21 sin el soporte de esta hormona, al producirse un descenso de la P_4 sérica (Johnston y col., 2001; Romagnoli, 2006)

La CAB es el único agonista dopaminérgico que ha sido utilizado para interrumpir la gestación en la gata. Verstegen y col. (1993), lograron interrumpir la

gestación en el 80% de las gatas tratadas (4/5) mediante la administración de CAB a partir del día 30 de gestación. El aborto se inició cuando los niveles séricos de P_4 descendieron a menos de 1 ng/mL. Esta disminución ocurrió entre los 3 y 4 d del TRT (Verstegen y col., 1993). En concordancia Erüinal-Maral y col. (2004), lograron interrumpir la gestación en el 100% de los animales (8/8) entre los 34 y 42 d al administrarles CAB oral (15 μ g/kg/día) durante 5.6 ± 1.5 d. En contraposición, cuando la droga fue administrada entre los 45 y 47 d de preñez no se logró interrumpir la gestación, manteniéndose altos niveles de P_4 (16.9 y 9.8 nmol/l). Sin embargo las gatas parieron cachorros prematuros. Como efecto colateral se observaron vómitos en el 5.5% de las gatas tratadas. Solamente en cuatro de las gatas incluidas en este estudio la fertilidad no se vio afectada (Erüinal-Maral y col., 2004).

Prostaglandinas

La PG induce la lisis del CL, estimula las contracciones uterinas y genera la dilatación cervical (Romagnoli, 2006; Johnston y col., 2001). Por tal motivo la administración seriada de PG natural o sintética en la segunda mitad de la gestación produce un descenso de la concentración de P_4 plasmática por lo que provoca el aborto con expulsión de los fetos (Felman y Nelson, 2000).

Se ha utilizado $PGF_{2\alpha}$ natural en una única dosis de 2 mg totales por vía intramuscular al día 33 de gestación, generando el aborto con la expulsión de fetos en la totalidad de las gatas tratadas (4/4). Se observó un descenso de la concentración de P_4 plasmática a las 24 h de iniciado el TRT. Dentro de los efectos colaterales pudo observarse la ocurrencia de náuseas, vómitos, diarrea y postración 10 min posteriores a la administración (Verstegen y col., 1993). En concordancia, la administración de $PGF_{2\alpha}$ en una dosis de 500 a 1000 μ g/kg durante 2 d consecutivos produjo aborto 48 h después

de iniciado el TRT en gatas que presentaban más de 40 d de gestación. Por el contrario en aquellas gatas que presentaban menos de 40 d de gestación no ocurrió aborto (0/9) (Nachreiner y Marple, 1974; Bruce, 2002).

Baldwin y col. (2000), obtuvieron mejores resultados al utilizar $\text{PGF}_{2\alpha}$ natural a los 45 d de gestación (3/4) en comparación con los animales tratados al día 30 de gestación (1/4). Todos los animales recibieron la administración subcutánea de $\text{PGF}_{2\alpha}$ natural en una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dos veces en el primer día del TRT, seguido de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dos veces por día durante 5 d. Al abortar las gatas presentaron un nivel de P_4 sérico menor a 1.0 ng/mL (Baldwin y col., 2000; Bruce, 2002).

Protocolos combinados de agonistas dopaminérgicos y prostaglandina

La combinación de agonistas dopaminérgicos y PG tiene la finalidad de reducir la dosis y por lo tanto disminuir los efectos colaterales de ésta última (Wanke y col., 2002). Onclin y Verstegen (1997) administraron una única dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de CAB vía oral combinado con 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de CLO (PG sintética) durante 2 d por vía subcutánea en gatas que presentaban 30 d de gestación. La totalidad de las gatas abortaron a los 9 ± 1 d luego de la implementación del TRT. La concentración de P_4 plasmática fue decreciendo en forma rápida y constante generando la interrupción de la gestación. No se observaron efectos colaterales, excepto una descarga vulvar hemorrágica y la fertilidad postratamiento de las gatas no se vio afectada (Onclin y Verstegen, 1997). La asociación de agonistas dopaminérgicos y PG también fue utilizada por Erüal–Maral y col. (2004), quienes utilizaron CAB 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ vía oral con alfaprostol 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ por medio, vía subcutánea. Las gatas fueron divididas en dos grupos. El primer grupo ($n=6$) fue tratado entre los 25 y 40 d de gestación, mientras que el segundo grupo ($n=2$) entre 45 y 47 d de gestación. Todas las gatas del primer grupo abortaron entre 6.2 ± 1.9 d

de iniciado el TRT. Mientras que las gatas de segundo grupo parieron crías prematuras las cuales murieron 16 h después del parto. Algunas gatas presentaron vómitos como efecto colateral del TRT (Erüinal-Maral y col., 2004). Si bien en los estudios realizados se logró interrumpir la gestación media, no ocurrió lo mismo durante la gestación tardía lo cual podría relacionarse con la producción placentaria de P_4 ocurrida al final de la gestación en la gata. En los últimos años se han realizados diversos estudios para determinar la existencia de una fuente de P_4 placentaria durante la segunda mitad de la preñez en la gata. Malassine y Ferre (1979) afirmaron que la placenta felina contribuye de manera esencial a la secreción de P_4 (Malassine y Ferre, 1979). Dichos resultados concuerdan con los realizados por Scott (1970), quien afirmó que la secreción de P_4 por el CL es necesaria para mantener la gestación hasta el día 45-50 (Scott, 1970). En contraposición Verstegen y col. (1993) reportaron la ocurrencia de aborto en gatas que habían sido ovariectomizadas antes del día 50 de gestación (Verstegen y col, 1993). Por el contrario estudios recientes confirman la existencia de una fuente adicional de P_4 proveniente de la placenta, considerando a la misma un importante órgano endocrino capaz de contribuir el mantenimiento de la gestación en la gata (Siemieniuch y col., 2012).

Antiprogestágenos

Los antiprogestágenos son esteroides sintéticos que se unen a receptores de P_4 presentes en el útero, por lo cual interfieren con las acciones de la P_4 endógena, generando la interrupción de la gestación (Romagnoli, 2006).

Georgiev y Wehrend (2006), lograron interrumpir la gestación en el 87% de las gatas tratadas (20/23) al administrarles ALI (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 d consecutivos en gatas que presentaban 25 a 26 d de gestación. La concentración

sérica de P_4 fue incrementándose desde el día 25 al 29 de gestación. No se observaron efectos colaterales en los animales tratados, solamente una gata presentó prurito en el sitio de inyección durante las 3 h posteriores a la administración (Georgiev y Wehrend, 2006). Estudios posteriores demostraron que la ocurrencia del aborto se relacionaba con la separación útero-placentaria generada por la destrucción de las vénulas, mientras que las arteriolas permanecieron intactas. Este genera una hemorragia intersticial, seguida por la extravasación al lumen uterino que se relaciona con descarga vulvar hemorrágica (Georgiev y Wehrend, 2008).

En concordancia, Fieni y col. (2006) obtuvieron resultados similares al interrumpir la gestación del 88.5% de las gatas tratadas entre los 29 y 37 d de gestación con ALI (15 mg/kg/día), por vía subcutánea durante dos días consecutivos. El 59.2 % de las gatas que abortaron presentaron una descarga vulvar hemorrágica. Las concentraciones séricas de P_4 aumentaron 60 h postadministración de la droga, mientras que 30 h postaborto se registró un descenso de la misma. Como efectos colaterales pudo observarse que un pequeño número de gatas presentó inflamación en el sitio de inyección. Mientras que 4 gatas manifestaron períodos de anorexia, depresión, agitación y diarrea en los primeros 7 d de iniciado el TRT. Luego del aborto todas las gatas retornaron al estro, y un 77% quedaron preñadas en el celo posterior al aborto y un 10% más en el segundo celo (Fieni y col., 2006).

Georgiev y col. (2010), administraron ALI (10 mg/kg/día/sc) en el día 45 y 46 posterior al servicio. Cuatro de las 6 gatas tratadas abortaron entre 4-7 d de iniciado el TRT. Mientras que las 2 gatas restantes parieron crías a término. Se observó un incremento de la concentración sérica de P_4 al momento del aborto, y un posterior descenso alrededor del día 55. Todas las gatas retornaron al estro y quedaron preñadas. No se comunicaron efectos colaterales (Georgiev y col., 2010).

Goericke-Pesch y col. (2010) administraron ALI (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 d consecutivos en gatas al día 5 y 6 postservicio. Se realizó un control ultrasonográfico a los 25 d postservicio en el cual se pudo corroborar que ninguna de las hembras tratadas (11/11) estaba preñada. Al realizar la medición de P_4 se pudo observar un incremento de los niveles postadministración de la droga. Todas las gatas ciclaron y quedaron preñadas entre el primer y cuarto celo postratamiento. El TRT resultó efectivo para prevenir la gestación temprana, sin embargo no pudo diagnosticarse la ocurrencia de fecundación y desarrollo embrionario. Se postuló que el uso de ALI probablemente prevendría la nidación (Goericke-Pesch y col., 2010).

En resumen, en los últimos años se han utilizado diferentes protocolos para interrumpir la gestación en felinos, los mismos se basan en la administración de agonistas dopaminérgicos, PG, combinación de agonistas dopaminérgicos y PG o antiprogéstágenos. Si bien existen varios trabajos sobre la interrupción de la gestación media, no ocurre lo mismo con la gestación temprana y tardía. Los agonistas dopaminérgicos como la CAB, administrada en gatas que presentan una gestación media, han permitido obtener muy buenos resultados, con la ocurrencia de mínimos efectos colaterales. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando esta droga es administrada durante la gestación tardía, ya que la misma ha producido el nacimiento de crías prematuras, por lo cual su uso no es recomendado luego de los 45 d de gestación. Es una droga de costo moderado y disponible en el mercado nacional, por lo cual podría ser una opción adecuada para aquellas gatas que presentan una gestación entre 30 a 40 d.

La mayoría de los trabajos han documentado la administración de $PGF_{2\alpha}$ natural, la cual resultó eficaz para interrumpir la gestación media, sin embargo las hembras manifestaron efectos colaterales como náuseas, vómitos, diarrea y postración. Sin

embargo no existen comunicaciones sobre la administración de PG sintética para interrumpir la preñez en gatas. En contraposición si existen trabajos sobre el uso combinado de CAB junto con PG sintéticas, como el CLO o el alfaprostol. En dichos trabajos se ha logrado interrumpir la gestación media, reduciendo los efectos colaterales asociados a las PG. En contraposición se ha generado el nacimiento de crías prematuras cuando se administró CAB en combinación con alfaprostol durante la gestación tardía.

La administración de antiprogestágenos, como el ALI utilizado para interrumpir la gestación media en la gata, ha permitido obtener muy buenos resultados con la ocurrencia de mínimos efectos colaterales. Lo mismo puede observarse en la gestación temprana. Si bien sólo existen dos trabajos en este estadio de la preñez, sólo en uno de ellos se pudo diagnosticar la gestación y posterior interrupción de la misma; no obstante su uso durante los primeros días postservicio sería eficaz para prevenir la gestación al afectar la nidación. Sin embargo, la administración de ALI durante la gestación tardía generó que algunas gatas parieran crías a término.

La realización de controles ultrasonográficos periódicos es de gran importancia para evaluar los cambios que ocurren a nivel de los embriones y fetos. Este hecho toma especial relevancia si consideramos que generalmente no se evidencian cambios externos visibles que permitan determinar la interrupción precoz de la gestación.

En la mayoría de los trabajos en los que se utilizaron drogas para interrumpir la gestación, no se ha comunicado la fertilidad posterior al TRT, sin embargo este dato resulta de gran importancia en lo que respecta a la preservación de la salud reproductiva de cualquier hembra, en especial de aquellas que forman parte de un plantel reproductivo, por lo cual se busca que el protocolo implementado no afecte su futura fertilidad.

Finalmente protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación temprana o media con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirán mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros.

En virtud de lo anteriormente expuesto, los cuatro objetivos de esta tesis fueron:

1) relacionar diferentes parámetros ultrasonográficos con el DG y evaluar las fluctuaciones séricas de P_4 durante la gestación en la gata doméstica; 2) evaluar el efecto farmacológico del CLO y ALI para interrumpir la gestación temprana y media en felinos; 3) estudiar los cambios ultrasonográficos durante el TRT; 4) evaluar la fertilidad postratamiento. Para cumplir con estos cuatro objetivos se realizaron los experimentos que se describen en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO II

VARIACIONES ULTRASONOGRÁFICAS Y ENDOCRINOLÓGICAS EN LA GESTACIÓN FELINA

INTRODUCCIÓN

Debido a que la cópula en felinos es sumamente corta (3 a 5 segundos) raramente es observada por los propietarios de gatas mascotas. Es así que, en la clínica reproductiva diaria, es frecuente que el veterinario clínico deba estimar la EG de una hembra felina con el fin de calcular la fecha probable de parto, interrumpir la gestación o realizar una cesárea programada. Si bien se han realizado varios estudios sobre la gestación felina ninguno de ellos ha sido realizado a través de toda la gestación. Es así que en la actualidad, el médico veterinario no cuenta con datos precisos que le permitan estimar con exactitud la EG a partir de la implementación de métodos complementarios de rutina.

Uno de los primeros trabajos realizados sobre el diagnóstico y monitoreo ultrasonográfico de la gestación en las gatas fue realizado por Davidson y col. (1986). En su estudio se incluyeron 8 gatas, realizándose el primer examen ultrasonográfico a los 7 d postservicio. Los primeros cambios uterinos relacionados con la gestación fueron detectados entre los 11 y 14 d postservicio, a través de la visualización de los SG, registrándose mediciones del diámetro del SG. Más tarde, entre los 15-17 d postservicio, se realizó la medición del eje longitudinal del polo fetal, mientras que entre los 26-28 d de gestación se registró LCC. Entre los 16-20 d postservicio pudo evaluarse la viabilidad fetal a través de la identificación del latido cardíaco y entre los

28-30 d de gestación se identificaron los movimientos fetales. Los resultados mostraron una gran variabilidad entre fetos de la misma camada y entre fetos de diferentes camadas, por lo cual no pudieron correlacionar estas mediciones con la EG. Sin embargo pudo observarse una tendencia a un aumento del tamaño de los SG con la EG. La incapacidad de identificar a los fetos en exploraciones sucesivas, podría explicar por qué no se correlacionaron las mediciones ultrasonográficas y la EG.

Más tarde Beck y col. (1990) realizaron un estudio sobre la funcionalidad y confiabilidad del DB y DT como indicadores de EG en la gata. Para ello utilizaron 8 gatas mestizas a quienes se les realizó un seguimiento ultrasonográfico desde que se confirmó la preñez (38 d antes del parto) hasta el parto con intervalos de 15 d. A partir de los resultados obtenidos pudieron observar que el DT aumenta a un ritmo más rápido que el DB. Así mismo demostraron una regresión lineal entre el DB y el DT y la EG, pudiendo concluir que estas mediciones fetales resultan una herramienta práctica y precisa en la evaluación de la EG y son un indicador potencialmente útil para estimar la fecha probable de parto en gatas a las que se desconoce la fecha de servicio. Sin embargo la resolución del equipo ultrasonográfico no permitió la diferenciación del DB antes del día 38 previo al parto (Beck y col., 1990).

Con el objetivo de realizar un seguimiento ultrasonográfico de la gestación temprana en gatas, Zambelli y col. (2002) realizaron una comparación entre las medidas anatómicas y ultrasonográficas del diámetro externo del SG y largo embrionario-fetal hasta el día 30 de gestación. Los resultados mostraron una correlación lineal entre las mediciones ultrasonográficas mencionadas y la EG. Este estudio permitió confirmar las mediciones obtenidas mediante ultrasonografía con las medidas anatómicas y confirmar una correlación lineal entre las medidas ultrasonográficas y la EG. Continuando con esta investigación Zambelli y col. (2004) realizaron un estudio para estimar la EG en las

gatas durante la segunda mitad de la preñez. A partir de los resultados obtenidos se demostró una regresión lineal entre las mediciones fetales (DB, DT y diámetro del estómago fetal) y la EG.

Recientemente Beccaglia y Luvoni (2012) utilizaron el diámetro interno de la cavidad coriónica y el DB para estimar la fecha probable de parto, mediante la aplicación de ecuaciones derivadas de curvas de crecimiento. El diámetro interno de la cavidad coriónica fue identificado y medido en la semana 4 y 5 de gestación, mientras que el DB fue medido entre la semana 5 a 9 de preñez. Los resultados que obtuvieron muestran que tanto el diámetro interno de la cavidad coriónica y el DB pueden ser utilizados para estimar la fecha probable de parto. En la semana 4 de preñez el diámetro interno de la cavidad coriónica tiene una mayor exactitud en la predicción de la fecha probable de parto que el DB, sin embargo en la semana 5 de preñez tanto el diámetro interno de la cavidad coriónica como el DB son igualmente precisos. El DB tiene una alta precisión (± 1 día) hasta la semana 6 de gestación, sin embargo luego se observa una disminución gradual, manteniendo una exactitud de ± 2 d hasta la semana 8 de gestación. La superposición de múltiples fetos en el campo de la imagen ecográfica, es una de las causas de la pérdida de exactitud para determinar la fecha probable de parto a partir del DB.

En mamíferos, la P_4 es necesaria para que pueda establecerse y mantenerse un ambiente uterino adecuado para el desarrollo embrionario y fetal. Durante la gestación las fuentes de P_4 así como la importancia de los órganos secretores de esta hormona varían entre las especies animales. En la gata, Swanson y col. (1995) pudieron observar un incremento de la concentración de P_4 sérica a partir de las 76 a 124 h después de la primera cópula, describiéndose un incremento significativo entre las 100 y 124 h, con valores de alrededor de 15 ng/ml. Este aumento en la actividad luteal fue coincidente

con un incremento significativo de la cantidad de tejido luteal y de la cantidad de receptores luteales a LH, entre las 100 y 124 h posteriores a la primera cópula (Swanson y col., 1995). Resultados similares obtuvieron Schmidt y col. (1983), quienes comunicaron un aumento de la P_4 sérica a partir del día 4 del estro; dicho niveles continuaron incrementándose hasta alcanzar un pico de 24.2 ng/mL al día 23 de gestación. Desde el día 16 al 44 de preñez la concentración de P_4 se mantuvo elevada (12.1-24.2 ng/mL), sin embargo se observó una disminución gradual de la P_4 sérica a partir del día 44 la cual continuó hasta el parto (Schmidt y col., 1983; Figura 2.1.).

Si bien el CL produce P_4 durante un mínimo de 40 a 50 d, manteniendo niveles elevados de P_4 , las cantidades elaboradas después del día 49 son escasas (Feldman y Nelson, 2000). Recientemente Braun y col. (2012) y Siemieniuch y col. (2012) comunicaron que la placenta es una fuente adicional de P_4 en la gatas preñadas, siendo la concentración de P_4 placentaria baja durante la gestación temprana y aumentando sus niveles a la largo de la misma. Por tal motivo la placenta podría ser considerada un importante órgano endocrino para mantener la preñez en las gatas (Siemieniuch y col., 2012).

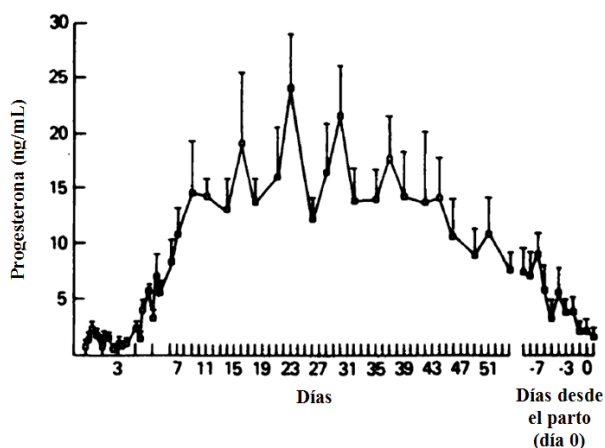


Figura 2.1. Media \pm ES de concentración de P_4 durante el estro, gestación (intervalo 1-54 d), y el intervalo parto (desde el día 9 antes del parto hasta el día 1 después del parto, adaptado de Schmidt y col., 1983).

La ultrasonografía es una técnica no invasiva que permite realizar un diagnóstico preciso de la gestación y evaluar el desarrollo embrionario-fetal y las estructuras extrafetales. A partir de la revisión de la bibliografía desarrollada en esta área puede observarse que las mediciones del SG y feto pueden ser utilizadas para estimar la EG y la fecha probable de parto. Así mismo la correlación entre las mediciones ecográficas y la EG puede ser usada para monitorear el desarrollo de la gestación. Si bien se han realizado estudios ultrasonográficos y endocrinológicos sobre la gestación en la gata, los mismos han sido realizados en periodos predeterminados de la preñez y con un número escaso de observaciones. Por tal motivo la realización de estudios sobre la gestación felina en los cuales se incremente el número de observaciones, y se realice un seguimiento diario ultrasonográfico y endocrinológico permitirá evaluar el desarrollo embrionario-fetal, así como también las fluctuaciones hormonales a lo largo de la preñez, lo cual resultará una herramienta de suma importancia para la clínica reproductiva diaria.

El objetivo de este capítulo fue relacionar diferentes parámetros ultrasonográficos con el DG y evaluar las fluctuaciones séricas de P_4 desde el día 21 de gestación hasta el DPP en la gata doméstica.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que los parámetros ultrasonográficos permitirán estimar el DG en la gata doméstica desde el día 21 de gestación hasta el DPP. Así mismo la P_4 sérica fluctuará durante la gestación, siendo significativamente más baja la concentración sérica en el último tercio de la preñez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 16 gatas, de raza mestiza, de entre 24 y 36 meses de edad, sanas, con un peso entre 3 a 4 kg, y 2 gatos mestizos, sanos, con un peso entre 3 a 5 kg.

Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de acero, recibieron alimento comercial (Fit 32[®]; Royal Canin, Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*. Cuarenta y cinco días previos al inicio del estudio y hasta el final del mismo los animales se mantuvieron en una habitación acondicionada, con temperatura constante a 22°C. Se utilizó un régimen de luz artificial de 14 h-luz-diaria (fotoperíodo largo) con lámparas incandescentes de 100 W, a fin de obtener la ciclicidad de las hembras (Robledo y col., 2003). Las gatas utilizadas fueron incluidas en un plan de control urbano de la reproducción.

Criterios de inclusión

Las hembras utilizadas en el presente estudio fueron incorporadas en base a los siguientes criterios de inclusión: 1) madurez sexual, 2) peso igual o superior a 3 kg e igual o inferior a 4 kg, 3) plan sanitario completo, 4) adecuado estado nutricional, 5) no gestantes, 6) no presentar ninguna alteración al examen físico, y 7) no estar recibiendo ningún tipo de medicación.

Los machos utilizados en el presente estudio fueron incorporados en base a los siguientes criterios de inclusión: 1) madurez sexual, 2) fértiles, 3) plan sanitario completo, 4) adecuado estado nutricional, 5) clínicamente sano, 6) no estar recibiendo ningún tipo de medicación.

Marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y utilizando las recomendaciones de la Academia de Ciencias de EEUU referidas al uso de felinos como animales de laboratorio (National Research Council 2002). Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras de sangre y procedimientos experimentales (National Research Council 2002). Además contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV-UNLP (26-3-12).

Diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado (Petersen, 1985). Los animales fueron sometidos a un período de aclimatación durante 45 d (Gimenez y col., 2009). Las gatas fueron controladas diariamente mediante citología vaginal y signología conductual del estro. Al tercer día de presentar una citología vaginal correspondiente al celo, las gatas se colocaron junto con el macho y se documentó el primer servicio. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación y ecografía abdominal 20 d posteriores al día del servicio (Zambelli y Prati, 2006). Diariamente se registró el estado general de los animales. Se realizó un seguimiento ultrasonográfico (Ecógrafo Mindray™, DP-6600 vet, Nanshan, China, sonda lineal multifrecuencia [5-7,5-10 MHz]) desde el día 21 de gestación hasta el parto (Figura 2.2.).

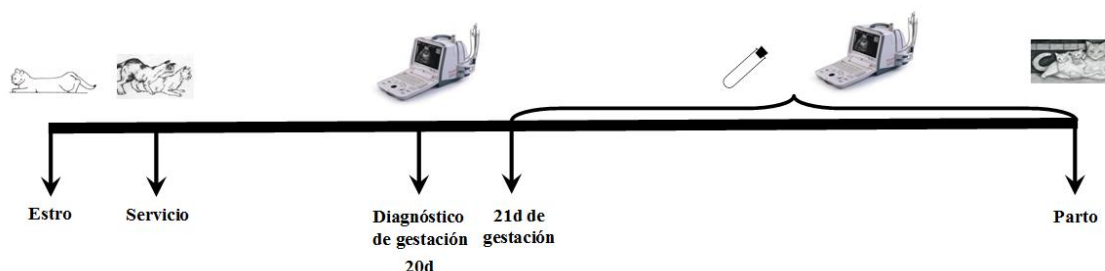


Figura 2.2. Diseño experimental utilizado para el estudio de la gestación en la gata doméstica.

A través del seguimiento ultrasonográfico se procedió a realizar mediciones del SG. Mediante calibres electrónicos se realizaron dos cortes del SG, uno LON y otro TRV. Mediante el uso de imágenes congeladas en el corte LON se registraron dos dimensiones una LON y otra ATP mientras que en corte TRV se registró una sola dimensión TRV (Keats y Sistrom, 2002; Figura 2.3.)

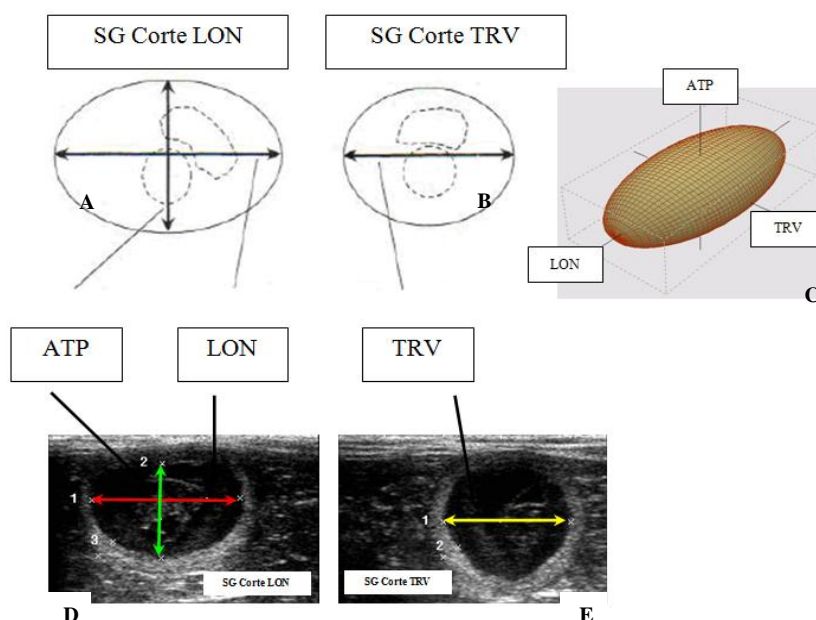

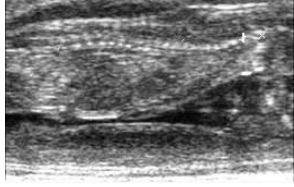






Figura 2.3. Imágenes del SG: A, B, C: Ilustración de las mediciones de los diámetros del SG LON y TRV del útero grávido durante las ecografías (adaptado de Keats y Sistrom, 2002). D, E: Imagen ultrasonográfica del SG de 21 d de gestación en la gata. SG Corte LON: calibre 1 (LON), calibre 2 (ATP). SG Corte TRV: calibre 1 (TRV), calibre 2 (pared del SG). Transductor lineal 7,5 MHz (García Mitacek y col., 2012)

Con los registros obtenidos se calculó: 1) VSG aplicando la fórmula de la elipse elongada ($4/3\pi * [LON/2 * ATP/2 * TRV/2]$); 2) DSG con calibres electrónicos promediando 3 mediciones ortogonales realizadas en imágenes congeladas; 3) Medición de la pared del SG. También se realizaron registros ultrasonográficos sobre los fetos, desde el día 35 de gestación al parto, por medio de los cuales se determinó: a) LCC, atravesando el eje LON corporal; b) DB, atravesando el plano TRV de la cabeza; c) DT, atravesando el eje TRV corporal (Tabla 2.1.). Se estableció la relación entre parámetros ultrasonográficos y los DG.

Tabla 2.1. Fotos e imágenes ultrasonográficas de fetos de 40 d de gestación en la gata. Transductor lineal 7,5 MHz.

Medición ultrasonográfica	Foto	Imagen ultrasonográfica
LCC ⁽¹⁾		
DB ⁽²⁾		
DT ⁽³⁾		

⁽¹⁾LCC: Longitud craneo-caudal, ⁽²⁾DB: Diámetro Biparietal, ⁽³⁾DT: Diámetro Transverso abdominal

En la totalidad de las gatas se tomaron muestras de sangre desde el día 21 de gestación hasta DPP. Todas las muestras de sangre fueron extraídas por punción de la vena yugular, centrifugadas y almacenadas a -20° C hasta que las concentraciones de P₄ fueron determinadas por RIA de fase sólida usando I¹²⁵ (Coat-A-Count®, Progesterona Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto de P₄ (6.4 ng/mL) fue 5.0% y para el pool bajo (0.9 ng/mL) fue 4.1%. Diariamente se registró el estado general de los animales.

Detección del estadio del ciclo estral

Diariamente se observó el comportamiento de las gatas solas y en relación con el macho. Luego se tomaron muestras del epitelio vaginal mediante hisopos para realizar el estudio de las citologías vaginales y confirmar las observaciones obtenidas. Las citologías fueron teñidas con azul de metileno y observadas al microscopio de luz a una magnificación de X 100 y X 400. En base al tipo y número de células observadas, se determinó el estadio del ciclo estral en el que se encontraban las gatas (Mills y col., 1979).

Las hembras fueron consideradas en estro cuando presentaron: 1) comportamiento de estro, 2) receptividad sexual y 3) citología vaginal compatible con estro (Johnston y col., 2001)

Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico

Durante el período de adaptación y período de estudio se registró el consumo tanto de agua como de alimento de todos los animales y se realizó un examen físico semanal, el cual incluyó: 1) observación del estado general, 2) registro de la condición corporal (Escala 1 a 5; Kronfeldy col., 1994); 3) medición de temperatura, 4)

auscultación torácica, 5) medición de la frecuencia cardíaca, 6) palpación abdominal. Las variaciones en los parámetros evaluados durante el examen físico fueron registradas.

Examen ultrasonográfico

La preparación de las gatas consistió en 8 h de ayuno sólido y tricotomía de la zona ventral del abdomen, desde el arco costal craneal hasta la región inguinal caudal y lateralmente a lo largo de la pared corporal. El examen ultrasonográfico se realizó en posición decúbito dorsal, sujetando suavemente las extremidades anteriores y posteriores por un asistente, sin requerir la sedación o anestesia de las gatas. Se colocó gel acústico sobre la piel para conseguir un contacto acústico adecuado entre el transductor y la piel de la gata.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo (diariamente entre el día 21 de gestación al DPP) en el que la unidad experimental fue la gata. Se fijó un nivel de significancia de $P < 0.05$. La concentración de P_4 se analizó como mediciones repetidas en el tiempo mediante el uso de PROC MIXED de SAS 9.1[®] (SAS, 2003). El modelo incluyó los efectos aleatorios de la gata y el efecto fijo del tiempo (DG).

Se realizó un análisis de correlación entre los parámetros evaluados (LON, ATP, TRV, VSG, DSG, pared del SG, LCC, DB, DT) y los DG con el PROC CORR de SAS[®] y un análisis de regresión múltiple utilizando los parámetros evaluados como variables dependiente y los DG como variable independiente con el PROC REG de SAS[®].

RESULTADOS

Todas las gatas (16/16, 100%) presentaron un desarrollo embrionario–fetal normal y parto eutócico. La duración de la gestación fue de 64.8 ± 0.53 d. El tamaño de camada fue de 3.1 ± 0.23 cachorros y se obtuvo el 100% de destete. Se observó una correlación positiva y significativa entre los parámetros estudiados (LON, ATP, TRV, VSG, DSG, pared del SG, LCC, DB y DT) y el DG ($P < 0.001$; Tabla 2.2.; Figura 2.4. – 2.6.). También pudo observarse una correlación positiva y significativa entre las mediciones del SG (LON, ATP, TRV y pared del SG) y una correlación positiva y significativa entre las mediciones fetales (LCC, DB y DT; Tabla 2.4.)

Tabla 2.2. Análisis de regresión múltiple de los parámetros evaluados durante el seguimiento ultrasonográfico.

Parámetro	$r^{2(10)}$	P ⁽¹¹⁾	Coefficientes
LON ⁽¹⁾	0.89	<0.001	$-54.3419 + (4.0349 \cdot DG) - (0.0327 \cdot DG^2)$
ATP ⁽²⁾	0.71	<0.001	$-4.0705 + (0.9974 \cdot DG) - (0.00704 \cdot DG^2)$
TRV ⁽³⁾	0.85	<0.001	$-24.0533 + (2.3234 \cdot DG) - (0.0207 \cdot DG^2)$
VSG ⁽⁴⁾	0.86	<0.001	$-27208.1220 + (1293.4785 \cdot DG)$
DSG ⁽⁵⁾	0.93	<0.001	$-27.0595 + (2.4277 \cdot DG) - (0.0198 \cdot DG^2)$
Pared del SG ⁽⁶⁾	0.46	<0.001	$-1.7281 + (0.2463 \cdot DG) - (0.00241 \cdot DG^2)$
LCC ⁽⁷⁾	0.70	<0.001	$-71.0221 + (3.9709 \cdot DG) - (0.0296 \cdot DG^2)$
DB ⁽⁸⁾	0.94	<0.001	$-5.8136 + (0.4539 \cdot DG)$
DT ⁽⁹⁾	0.77	<0.001	$-46.9206 + (2.1614 \cdot DG) - (0.0142 \cdot DG^2)$

⁽¹⁾LON: Longitudinal, ⁽²⁾ATP: Anteroposterior, ⁽³⁾TRV: Transversal, ⁽⁴⁾VSG: Volumen del Saco Gestacional, ⁽⁵⁾DSG: Diámetro del Saco Gestacional, ⁽⁶⁾Pared del SG: Pared del Saco gestacional, ⁽⁷⁾LCC: Longitud cráneo-caudal, ⁽⁸⁾DB: Diámetro Biparietal, ⁽⁹⁾DT: Diámetro Transverso abdominal, ⁽¹⁰⁾ r^2 : Coeficiente de regresión, ⁽¹¹⁾P: Probabilidad.

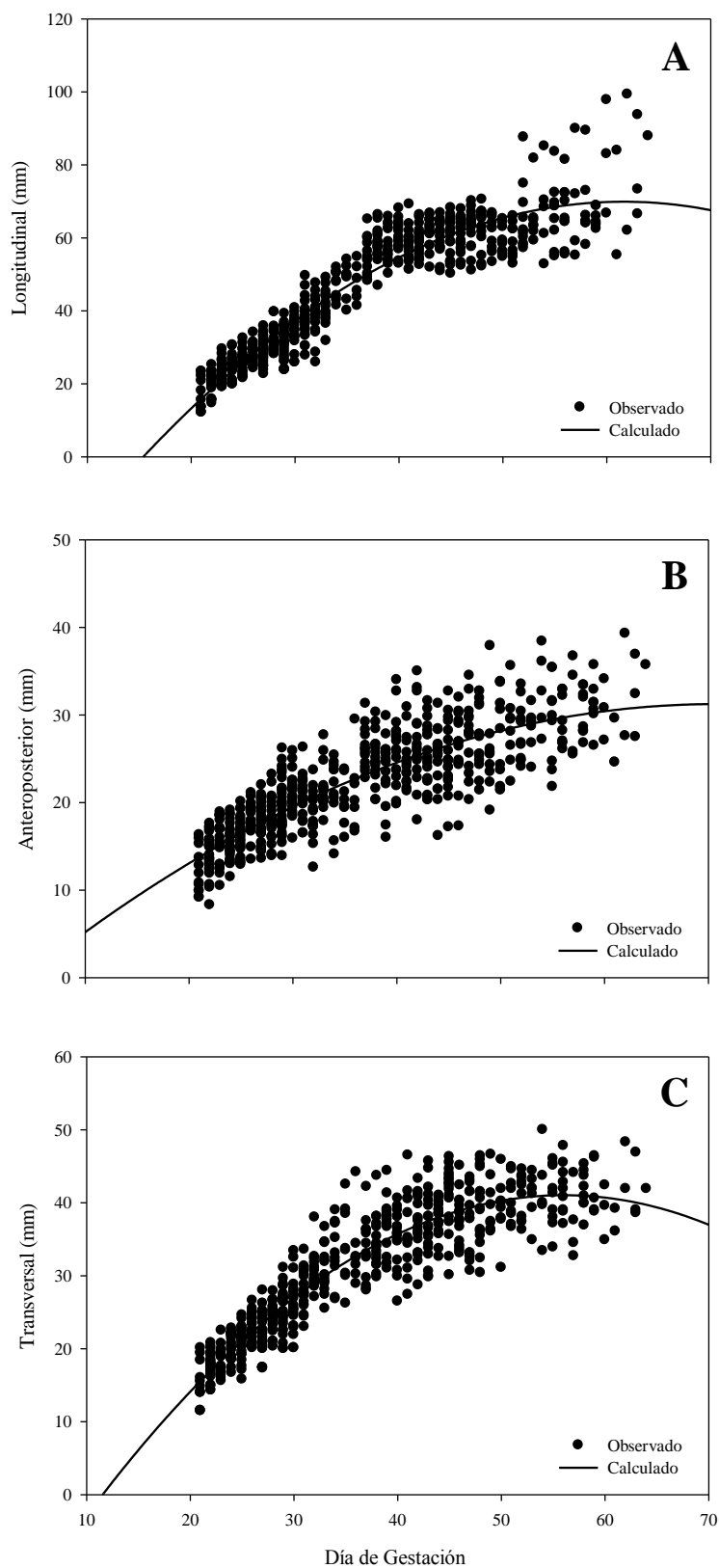


Figura 2.4. Análisis de regresión múltiple entre las dimensiones LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG y los DG utilizando un modelo polinomial.

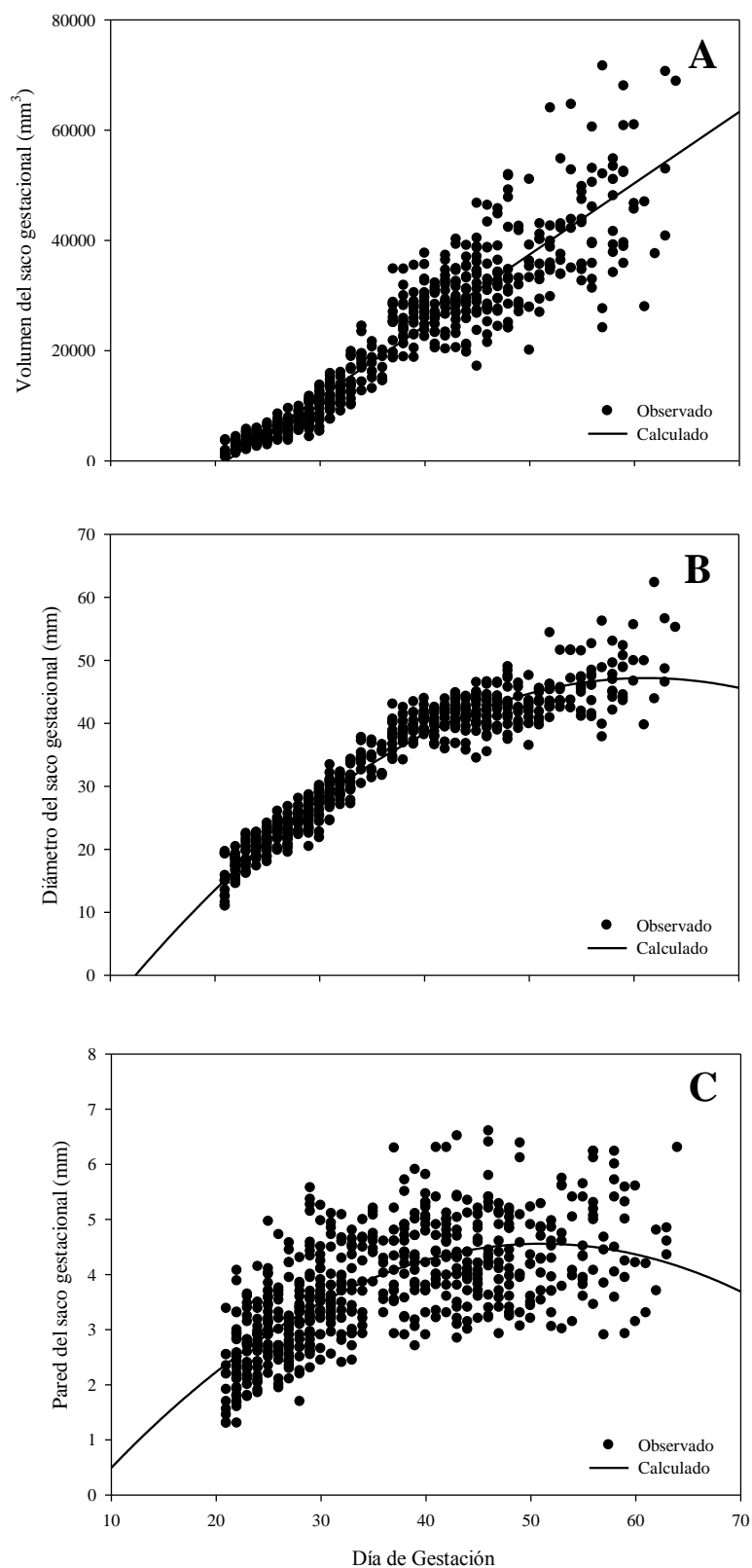


Figura 2.5. Análisis de regresión múltiple entre el VSG (mm³, A), el DSG (mm, B) y la pared del SG (mm, C) y los DG utilizando un modelo polinomial.

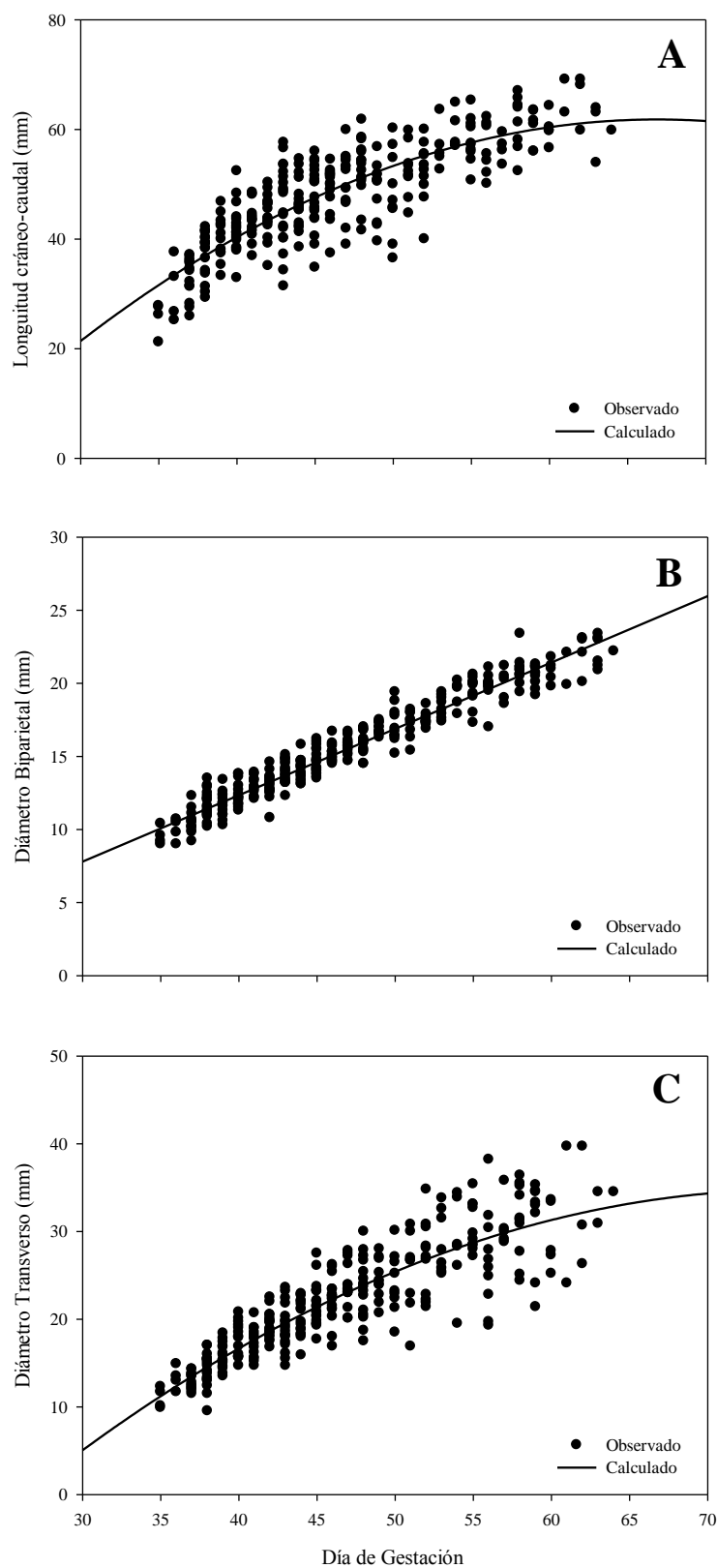


Figura 2.6. Análisis de regresión múltiple entre la LCC (mm, A), el DB (mm, B) y el DT (mm, C) y los DG utilizando un modelo polinomial.

Al analizar las concentraciones séricas de P_4 de las muestras obtenidas desde el día 21 al 63 de gestación pudo observarse que se alcanzó la concentración más alta el día 21 (35.52 ± 6.14 ng/mL). Entre el día 22 al 47 de gestación los niveles se mantuvieron en un rango entre 32.27 ± 4.25 y 16.25 ± 2.45 ng/mL. Sin embargo a partir del día 48 de preñez los niveles séricos de P_4 comenzaron a disminuir gradualmente, llegando a valores entre 9.82 ± 1.00 y 6.19 ± 1.98 ng/mL entre el día 53 al 62 de gestación, mientras que al día 63 se obtuvo un nivel de P_4 sérica de 4.76 ± 0.33 ng/mL (Figura 2.7.).

En el período 14 DPP - parto pudo observarse una disminución de la concentración sérica de P_4 , alcanzando un nivel de 2.99 ± 1.29 ng/mL un DPP (Figura 2.8.). Se observó una correlación positiva y significativa entre la P_4 y los DG y la P_4 y los DPP, y un alto coeficiente de regresión (Tabla 2.3.). Sin embargo pudimos observar una correlación negativa y significativa entre la concentración sérica de P_4 y las mediciones del SG (LON, ATP, TRV y pared del SG). Así mismo se observó una correlación negativa y significativa entre la concentración sérica de P_4 y las mediciones fetales (LCC, DB y DT; Tabla 2.4)

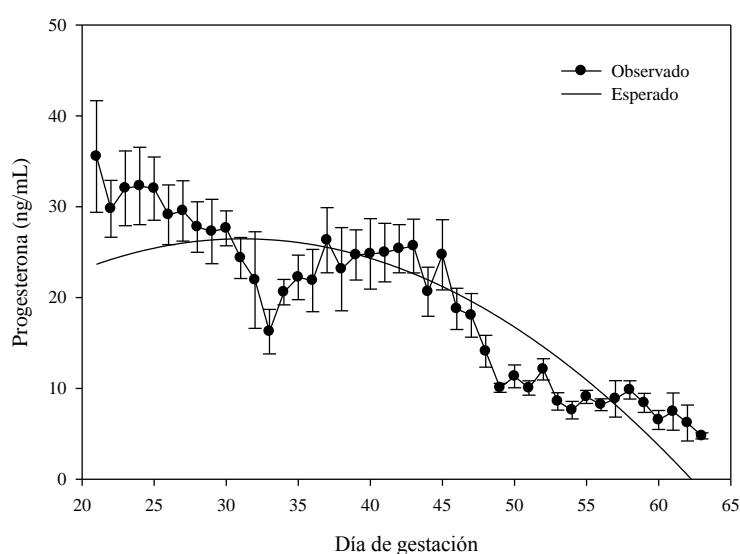


Figura 2.7. Cuadrados medios mínimos y ES de P_4 (ng/mL) desde el día 21 al 63 de gestación.

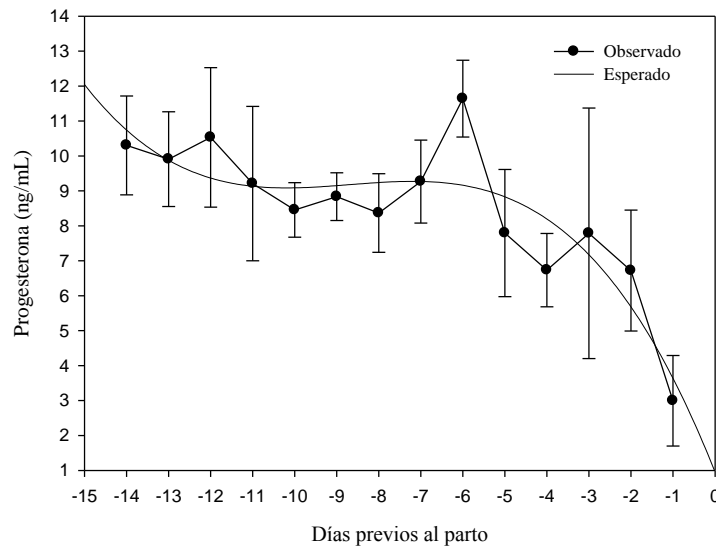


Figura 2.8. Cuadrados medios mínimos y ES de P_4 (ng/mL) desde el día 1 al 14 previo al parto.

Tabla 2.3. Análisis de regresión múltiple de las concentraciones de P_4 durante la gestación y DPP.

Parámetro	$r^{(1)}$	$P^{(2)}$	Coefficientes
P_4 DG ⁽³⁾	0.87	<0.001	$40.525 - (0.312 * DG) - (0.00423 * DG^2)$
P_4 DPP ⁽⁴⁾	0.75	0.009	$0,954 - (3,025 * DPP) - (0,359 * DPP^2) - (0,0138 * DPP^3)$

⁽¹⁾ r : Coeficiente de regresión, ⁽²⁾P: Probabilidad, ⁽³⁾ P_4 DG: Progesterona durante los días de gestación, ⁽⁴⁾ P_4 DPP: Progesterona del día previo al parto.

Tabla 2.4. Coeficiente de correlación de Pearson y probabilidad de los parámetros ultrasonográficos y endocrinológicos estudiados durante el periodo de 21 a 63 días de gestación.

$r/P^{(1)}$	LON ⁽²⁾	ATP ⁽³⁾	TRV ⁽⁴⁾	Pared del SG ⁽⁵⁾	LCC ⁽⁶⁾	DB ⁽⁷⁾	DT ⁽⁸⁾	P_4 ⁽⁹⁾
LON ⁽²⁾	1.00	0.80, <0.01	0.88, <0.01	0.67, <0.01	0.65, <0.01	0.57, <0.017	0.56, <0.01	-0.50, <0.01
ATP ⁽³⁾		1.00	0.72, <0.01	0.55, <0.01	0.39, <0.01	0.47, <0.01	0.48, <0.01	-0.52, <0.01
TRV ⁽⁴⁾			1.00	0.67, <0.01	0.40, <0.01	0.47, <0.01	0.42, <0.01	-0.46, <0.01
Pared del SG ⁽⁵⁾				1.00	0.14, 0.01	0.10, 0.07	0.07, 0.20	-0.36, <0.01
LCC ⁽⁶⁾					1.00	0.82, <0.01	0.80, <0.01	-0.43, <0.01
DB ⁽⁷⁾						1.00	0.87, <0.01	-0.58, <0.01
DT ⁽⁸⁾							1.00	-0.54, <0.01
P_4 ⁽⁹⁾								1.00

⁽¹⁾ r/P : Coeficiente de correlación/Probabilidad, ⁽²⁾LON: Longitudinal, ⁽³⁾ATP: Anteroposterior, ⁽⁴⁾TRV: Transversal, ⁽⁵⁾Pared del SG: Pared del Saco gestacional, ⁽⁶⁾LCC: Longitud cráneo-caudal, ⁽⁷⁾DB: Diámetro Biparietal, ⁽⁸⁾DT: Diámetro Transverso abdominal, ⁽⁹⁾ P_4 : Progesterona

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestra hipótesis, los polinomios obtenidos del análisis de diferentes parámetros ultrasonográficos (LON, ATP, TRV, VSG, DSG, LCC, DB y DT) resultaron efectivos para determinar los DG. Nuestros hallazgos concuerdan con el trabajo realizado por Beck y col. (1990) quienes demostraron una regresión lineal entre el DB y el DT y la EG. Sin embargo en dicho trabajo la resolución del equipo utilizado no permitió a los investigadores diferenciar el DB hasta los 38 DPP. Doce años más tarde, en concordancia con los mencionados hallazgos, Zambelli y col. (2002) demostraron una correlación positiva entre las medidas anatómicas y ultrasonográficas del diámetro externo del SG y largo embrionario-fetal. Así mismo sus resultados mostraron una correlación lineal entre las mediciones ultrasonográficas mencionadas y la EG. Este estudio permitió confirmar las mediciones obtenidas mediante ultrasonografía con las medidas anatómicas y confirmar una correlación lineal entre las medidas ultrasonográficas y la EG. Los datos obtenidos en nuestro trabajo se correlacionan con los hallazgos de Zambelli y col. (2002), sin embargo en el mencionado trabajo se analizaron sólo 7 d durante los primeros 30 d de la gestación (Zambelli y col., 2002). Más tarde Zambelli y col. (2004) demostraron una regresión lineal entre las mediciones fetales (DB, DT y diámetro del estómago fetal) y la EG los días 30, 35, 45, 50, 60 postservicio. Si bien los estudios realizados muestran una relación entre mediciones de imágenes ultrasonográficas y EG han sido realizados en momentos determinados de la gestación y con un número escaso de observaciones. En nuestro trabajo se realizó un seguimiento diario desde el diagnóstico de gestación a los 21 d postservicio hasta el DPP, abarcando los dos últimos tercios de la preñez, lo cual brinda un estudio completo de la evolución embrionaria-fetal y su relación con los registros ultrasonográficos. Así mismo el número de animales incluidos en nuestro

estudio, así como el número observaciones ultrasonográficos diarias realizadas sobre las hembras gestantes superó ampliamente a las realizadas en todos los trabajos antes mencionados. Nuestros resultados muestran que existe una relación entre el DG y los parámetros ultrasonográficos estudiados (LON, ATP, TRV, pared del SG, VSG, DSG, LCC, DB, DT) lo cual nos permite relacionar el crecimiento del SG y del embrión-feto con la EG. Así mismo las correlaciones positivas entre las mediciones del SG y mediciones fetales, así como los altos r^2 de los polinomios entre el DG y mediciones del SG (LON, ATP, TRV, pared del SG, VSG y DSG) y entre DG y las mediciones fetales (LCC, DB, DT) indican que los registros ultrasonográficos mencionados pueden ser utilizados para evaluar el desarrollo embrionario-fetal.

El DSG es la medición del SG que presenta el r^2 más alto, lo cual muestra que es el parámetro más confiable para estimar los DG. En contraposición la pared del SG presenta el r^2 más bajo, por lo cual resulta el parámetro menos confiable para estimar los DG. En el registro de las mediciones fetales el DB presenta el r^2 más alto, mostrando ser el parámetro más confiable para estimar los DG. En contraposición la LCC presenta el r^2 más bajo, por lo cual resulta el parámetro menos confiable para estimar los DG. Éstos resultados son de gran utilidad ya que en la actualidad el cálculo de la EG se realiza fundamentalmente a través de ecuaciones sobre mediciones fetales (DB, DT), las cuales podían aplicarse después del día 40 de gestación (Nyland y Mattoon, 2002). Sin embargo si el veterinario quiere calcular la EG previo a este periodo, sólo puede realizar una estimación a partir de los cambios ultrasonográficos embrionarios-fetales. Por tal motivo los resultados obtenidos en nuestro trabajo resultan de gran utilidad, ya que le brindan al veterinario un nuevo parámetro, el DSG, el cual permite calcular con exactitud los DG a partir del día 21 de preñez hasta el final de la misma. Así mismo a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, DB es el parámetro fetal que

puede ser utilizado para calcular con exactitud los DG desde el día 35 de preñez hasta el final de la misma. Por tal motivo el desarrollo de nuevas fórmulas que permitan estimar con precisión la EG desde el día 21 de gestación a partir de la utilización de otros parámetros ultrasonográficos además de los ya utilizados resultará de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria para poder identificar retardo del desarrollo fetal, calcular la fecha probable de parto, interrumpir la gestación o realizar una cesárea programada.

En muchas ocasiones la gata resulta ser una especie de difícil manejo durante el examen ultrasonográfico, ya que la hembra debe ser sujeta durante un período prolongado para la realización de un examen ultrasonográfico completo. La ventaja de tener disponibles parámetros ultrasonográficos altamente confiables para estimar los DG, le permitirá al veterinario utilizar menos parámetros para realizar la estimación de EG y de ésta forma reducir el tiempo del estudio.

En nuestro estudio pudo observarse que el día 21 de gestación se alcanzó el valor más alto de P_4 sérica, en los días subsiguientes los niveles fueron descendiendo, sin embargo los valores se mantuvieron por encima de 15 ng/mL. A partir del día 48 los niveles de P_4 comenzaron a disminuir gradualmente, llegando a valores por debajo de 10 ng/mL entre el día 53 al 62 e inferiores a 5 ng/mL al día 63, siendo el nivel de P_4 inferior a 3 ng/mL un DPP, pudiendo observarse una correlación positiva entre la concentración sérica de P_4 , los DG y los DPP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Verhage y col. (1976) quienes comunicaron el nivel más alto de P_4 plasmática al día 21 de gestación, luego se produjo un descenso gradual alcanzando niveles de 12.96 ± 0.9 ng/mL el día 50 y entre 4-5 ng/mL antes del parto (Verhage y col., 1976). Resultados similares obtuvieron Schmidt y col. (1983) quienes comunicaron un rango de P_4 entre 12.1-24.2 ng/mL entre el día 16-44 de gestación, obteniendo el valor más alto al día 23 de gestación. A partir del día 44 de preñez se observó un descenso

gradual y continuo de P_4 hasta el parto, siendo la concentración sérica de P_4 de 2.2 ng/mL el día del parto (Schmidt y col., 1983). Recientemente estudios realizados por Braun y col. (2012) y Siemieniuch y col. (2012) comunicaron que la placenta es una fuente adicional de P_4 en las gatas preñadas. Durante la gestación temprana la concentración de P_4 placentaria fue baja incrementándose a la largo de la misma. Así mismo Siemieniuch y col. (2012) comunicaron que la concentración plasmática de P_4 es baja durante la gestación temprana, se incrementa en la gestación media y disminuye en la gestación tardía. Por lo tanto la producción de P_4 placentaria puede ser considerada una fuente adicional de P_4 para mantener la preñez en las gatas (Siemieniuch y col., 2012). Los autores mencionados determinaron concentraciones de P_4 placentaria y plasmática mediante ELISA, mientras que en nuestro trabajo y los trabajos realizados por Verhage y col. (1976) y Schmidt y col. (1983) las determinaciones hormonales fueron realizadas por RIA. Las diferencias encontradas en los diferentes trabajos pueden relacionarse con los hallazgos de Nagy y col (1998) quienes compararon la concentración plasmática de P_4 determinada mediante ELISA y RIA, comprobando que ambas técnicas permiten detectar niveles de P_4 , sin embargo, los valores obtenidos mediante ELISA son mayores que los valores obtenidos mediante RIA (Nagy y col., 1998).

Si bien el diagnóstico presuntivo de gestación en felinos puede realizarse con diferentes métodos, el examen ultrasonográfico permite confirmar la preñez en forma temprana y brinda información sobre el desarrollo y la viabilidad embrionaria-fetal. Los hallazgos ultrasonográficos obtenidos en nuestro trabajo podrían utilizarse en la estimación de la EG y cálculo de la fecha probable de parto en la gata. A diferencia de los perros en los cuales existe gran variabilidad de tamaño en relación a la raza, en los gatos domésticos hay escasa variabilidad de tamaño entre las diferentes razas de gatos

así como entre los gatos mestizos y los de raza (Davidson y col., 1986). Es así que los registros ultrasonográficos realizados en este trabajo pueden ser utilizados para el cálculo de la EG de la especie. Los hallazgos ultrasonográficos obtenidos en el presente estudio permitirán confeccionar una tabla de doble entrada en la cual puede calcularse los DG a partir de las mediciones del SG y fetales, así como también a partir del día del servicio evaluar si el tamaño del SG o feto es el esperado para la EG del feto/embrión en relación al día del servicio (Apéndice I). Por lo tanto las ecuaciones obtenidas en nuestro trabajo resultarán de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria ya que el veterinario tendrá una nueva herramienta para calcular la EG y de esta forma evaluar el desarrollo embrionario-fetal, así como diagnosticar en forma temprana alteraciones de la preñez relacionadas con el crecimiento embrionario-fetal. Así mismo la detección temprana de retraso de crecimiento fetal durante la gestación será de utilidad para implementar medidas que incrementen las probabilidades de que la gestación llegue a término y ocurra el nacimiento de gatitos sanos. El cálculo de la fecha probable de parto mediante mediciones ultrasonográficas y estimación de la EG, nos permitirá realizar un manejo racional y controlado del parto, disminuir el riesgo de distocias y aumentar la sobrevivencia neonatal. Es así que los datos obtenidos en el presente estudio serán de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria.

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que los parámetros ultrasonográficos estudiados en nuestro trabajo (LON, ATP, TRV, pared del SG, VSG, DSG, LCC, DB y DT) pueden ser utilizados para el cálculo de la EG de la gata entre los 21 y 63 d de gestación. Así mismo nuestros resultados muestran que existe una relación entre el DG y la

concentración sérica de P_4 , lo cual nos permite relacionar las fluctuaciones de dicha hormona con la EG. Así mismo los altos r^2 de los polinomios entre el DG y la concentración sérica de P_4 indican que las fluctuaciones mencionadas pueden ser utilizadas para evaluar los cambios endocrinológicos durante la gestación. Estos hallazgos resultan de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria para el seguimiento clínico, ultrasonográfico y endocrinológico de la gestación en la gata doméstica.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FARMACOLÓGICA DEL CLOPROSTENOL Y AGLEPRISTONE PARA INTERRUMPIR LA GESTACIÓN TEMPRANA EN FELINOS

INTRODUCCIÓN

La interrupción de la gestación no deseada en la gata doméstica es una opción terapéutica utilizada con frecuencia en la clínica reproductiva de pequeños animales. Esta práctica evita el nacimiento de crías no deseadas, muchas de las cuales incrementarán la población de animales callejeros, los cuales presentarán expectativas de vida poco favorables. Durante décadas se han descrito varios métodos para interrumpir la preñez no deseada en hembras felinas, los cuales han sido revisados y más tarde perfeccionados mediante la realización de estudios clínicos y experimentales. La implementación del protocolo utilizado para interrumpir la gestación dependerá de las características fisiológicas, del estadio de la preñez, de los efectos colaterales de las drogas utilizadas así como la disponibilidad de las mismas.

La gestación en la gata depende de la actividad lútea (Verstegen y col., 1997). La principal función del CL es la secreción de P_4 , la cual prepara al útero para el inicio y mantenimiento de la gestación, a través de la estimulación del desarrollo, diferenciación y secreción glandular del endometrio. A su vez interviene en la secreción endometrial de compuestos específicos (glicoproteína mucínica, lactógeno placentario, osteopontinas) necesarios para el desarrollo embrionario, adherencia y nidación antes de la implantación (Spencer y col., 2004). La P_4 , también interviene en la formación de la placenta, mantenimiento de la adherencia placentaria, reducción de la contractilidad del

miometrio y mantenimiento de la inmovilidad uterina por múltiples mecanismos (Wanke y col., 2002).

El CL se forma a partir de la pared del folículo, la cual se colapsa y se pliega después de la ovulación. Los pliegues de tejido que protruyen hacia adentro de la cavidad contienen células de la granulosa y de teca así como también un sistema vascular sanguíneo que debe respaldar el crecimiento y la diferenciación celular. Durante la luteinización, las células de la granulosa pasan de secretar E_2 a P_4 (Cunningham y Klein, 2009). Es por ello que postovulación la concentración de P_4 plasmática aumenta por encima de la concentración basal, siendo su aumento progresivo y llegando a niveles de entre 15 a 30 ng/mL entre los 25 y 30 d de gestación (Johnston y col., 2001).

En la mayoría de los animales domésticos (vacas, cabras, caballos, cerdas, ovejas) la regresión del CL en la hembra no gestante está controlada por la secreción uterina de $PGF_{2\alpha}$. La vida media del CL debe ser suficientemente larga para permitir que el conceptus recién formado sintetice y libere los factores que aseguren la inhibición de la síntesis de PGF uterina. Por el contrario, en hembras vacías el CL debe lisarse para permitir que la hembra retorne al estro y pueda preñarse en un tiempo relativamente corto. En los animales domésticos de producción, en ausencia de preñez, la fase lútea tiene una duración cercana a los 14-17 d, esto permite que vuelvan a ciclar a intervalos relativamente frecuentes. Sin embargo, en las gatas no gestantes que presentan CL luego de haber presentado ovulación espontánea o coito con falla en la concepción, no existe la presencia de un sistema que promueva la luteolisis y permita el inicio temprano de los ciclos. Es así que el CL regresa por envejecimiento, siendo la duración de la fase lútea de aproximadamente 35 d (Cunningham y Klein, 2009).

Luego de la implantación la unidad fetoplacentaria es la encargada de extender la actividad lútea, lo cual permite el mantenimiento de la preñez (Cunningham y Klein, 2009). Así mismo, la PRL al ser una hormona luteotrófica, posibilita el mantenimiento del CL, incrementando su concentración sérica a partir del día 35 de gestación (Johnston y col., 2001; Verstegen, 1998). Otra hormona que hace sinergia con la P_4 para sostener la preñez es la relaxina, la cual es una hormona placentaria que empieza a producirse aproximadamente alrededor del día 20 de gestación (Cunningham y Klein, 2009).

La P_4 cumple un rol importante en la preñez de la gata, por tal motivo el descenso de las concentraciones de P_4 circulante se relaciona con interrupción de la gestación. Es así que los protocolos para interrumpir la gestación se basan en la administración de drogas que disminuyan las concentraciones de P_4 circulantes actuando sobre el CL o en el bloqueo de los receptores de P_4 presentes en el útero. Se han realizado diferentes estudios sobre la interrupción de la gestación en la gata, sin embargo el uso de análogos de $PGF_{2\alpha}$ y antiprogestágenos durante la preñez temprana ha sido poco documentado.

Las PG son prostanoideos naturales derivados del ácido araquidónico y se encuentran en todos los tejidos. Las PG son sustancias reguladoras con múltiples y variados efectos sobre la actividad bioquímica de los tejidos de los sistemas vascular, gastrointestinal, respiratorio y reproductivo. Se ha visto que la PGF tiene efectos luteolíticos y uterotónicos en la mayoría de las especies mamíferas estudiadas (Wanke y col., 2002). La actividad luteolítica se produce debido a que la PGF induce a la constricción de los vasos útero-ováricos causando isquemia, afectando a las células luteales e interfiriendo la síntesis de P_4 (McDonald's, 2003). Además, la PGF tiene efectos potenciales sobre otros sistemas corporales que explican los efectos secundarios

de la droga (hipersalivación, vómitos, bradicardia, reflejo de defecación y micción) observados en la implementación de los protocolos abortivos (Wanke y col., 2002)

Debido a sus efectos luteolíticos, la PGF natural, ha sido utilizada para la interrupción de la gestación en la perra en diferentes estadios de la preñez, sin embargo existen escasas comunicaciones sobre el uso de estas drogas en felinos (Wanke y col., 2002). El uso de múltiples dosis de PGF natural produjo depresión de la función lútea sin luteólisis completa en gatas que presentaban pseudopreñez de entre 21 y 25 d (Shille y Stabenfeldt, 1979). En contraposición Verstegen y col. (1993) observaron que al administrar PGF natural en gatas que presentaban una preñez de 33 d, produjo un descenso de los niveles de P_4 plasmática, causando aborto (Verstegen y col., 1993).

Los potentes análogos sintéticos de las PGF, como el CLO, ha sido utilizado en forma efectiva para interrumpir la gestación en perras (Fieni y col., 1989; Fieni y col., 1997). Así mismo se ha comunicado el uso de CLO para inducir la luteólisis en varias especies (Cuervo-Arango y Newcombe, 2010; Martins y col., 2011). En los últimos años se ha incrementado su uso debido a que las PG sintéticas son más potentes que la PG natural, y además se ha observado que se reducen los efectos colaterales (Wanke y col., 2002). En gatas, Onclin y Verstegen (1997) utilizaron CLO en combinación con un agonista de la dopamina para interrumpir la gestación obteniendo buenos resultados (Onclin y Verstegen, 1997). Sin embargo, no se han realizado otros estudios sobre el uso del CLO solo o en combinación con otras drogas en ningún estadio de la gestación. Por lo tanto el uso de CLO, una droga luteolítica de existencia en nuestro país y costo accesible, podría ser una opción interesante para interrumpir la gestación en gatas que presentan una preñez de entre 21-22 d.

Los antiprogestágenos son esteroides sintéticos que se unen con gran afinidad a receptores de P_4 evitando la acción de la P_4 endógena. Después del descubrimiento del

receptor de P_4 en 1970, se realizaron diversas investigaciones acerca de un antagonista del receptor de la P_4 , el cual jugaría un rol de gran importancia a nivel del tracto reproductivo femenino. Los estudios continuaron y en 1981, Philibert, Deraedt y Teutsch, de la compañía farmacéutica Roussel Uclaf, comunicaron un nuevo antagonista del receptor de P_4 conocido con el nombre de RU 38486, posteriormente con el correr de los años, resultó la abreviatura a RU 486 y actualmente es conocido con el nombre genérico de mifepristone (Spitz y col., 1996). El mifepristone ha sido implementado para la interrupción de la gestación en mujeres (Spitz y col., 1996). Más tarde, en el Centro de Investigación Roussel-Uclaf se obtuvo otra molécula, derivada directamente de la molécula mifepristone, a la que se asignó el código RU 534, cuyo nombre genérico es aglepristone. El ALI es el primer antiprogéstágeno registrado para uso en medicina veterinaria, es un esteroide sintético que se une a receptores de P_4 presentes en el útero, por lo cual interfiere con las acciones de la P_4 endógena, generando la interrupción de la gestación (Hoffman y Schuler, 2000; Figura 3.1.)

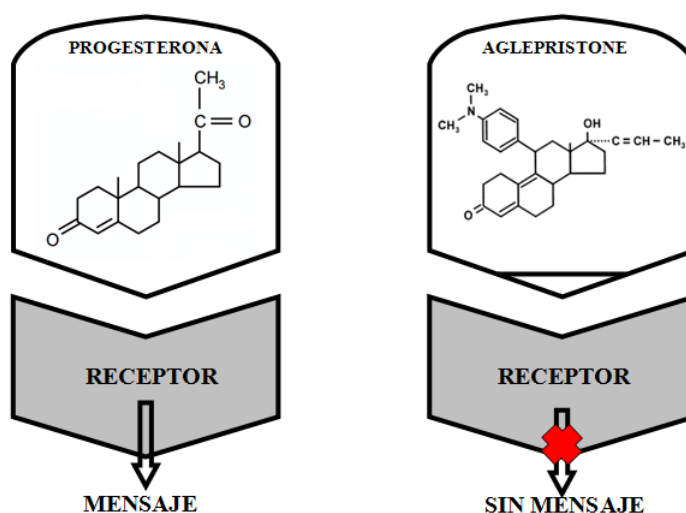


Figura 3.1. Estructura química de la P_4 y el ALI, y mecanismo de acción del ALI. El ALI se une a receptores de la P_4 , evitando la acción de la P_4 endógena e interrumpiendo la transmisión del mensaje endocrino que permite el mantenimiento de la gestación (adaptado de Hoffman y Schuler, 2000).

Se han realizado diferentes estudios sobre interrupción de la gestación en perras (Concanon y col., 1990; Forsberg y col., 1992; Fiéni y col., 1996; Onclin y Vestergén, 1996; Galac y col., 2000; Fiéni y col., 2001), sin embargo existen pocos estudios en gatas. El ALI ha sido utilizado en caninos con buenos resultados y sin ocurrencia de efectos colaterales indeseables (Galac y col., 2000; Fiéni y col., 2001). Los escasos datos publicados sobre el uso de ALI en gatas sugieren que podría ser una alternativa eficaz para la interrupción de la gestación en esta especie (Georgiev y Wehrend 2006; Fiéni y col., 2006; Nuñez Favre y col., 2007; Georgiev y Wehrend 2008).

En la mayoría de los estudios en los que se utilizan drogas para interrumpir la gestación no se ha comunicado la fertilidad posterior al TRT, sin embargo este dato resulta de gran importancia para estimar si la droga permite preservar la salud reproductiva de la hembra, en especial de aquellas que forman parte de un plantel reproductivo, en las cuales se busca que el protocolo implementado no afecte su futura fertilidad. Es así que estudios sobre este tópico brindarían datos importantes para la aplicación de esta droga en la clínica reproductiva.

Durante la gestación la ultrasonografía se utiliza no sólo para el diagnóstico gestacional sino también para la evaluación de la viabilidad embrionaria-fetal. Diversos parámetros tales como la evaluación de la morfología y VSG, movimientos fetales y evaluación de latidos cardíacos permiten estimar la viabilidad embrionaria-fetal y valorar el riesgo de pérdida gestacional (Nyland y Mattoon, 2002; Keats y Siström, 2002; Zambelli y Prati, 2006). Por tal motivo el seguimiento ultrasonográfico durante la implementación de un protocolo para interrumpir la gestación resulta de suma importancia ya que permite evaluar los cambios que ocurren a nivel embrionario-fetal, así como también la involución uterina una vez finalizado el TRT. Los datos obtenidos

serían de suma importancia en la detección temprana de sufrimiento embrionario/fetal así como de involución uterina anormal.

En resumen, el desarrollo de nuevos protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación temprana con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirá mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros. Conjuntamente la evaluación de la fertilidad posterior a la interrupción de la gestación con diferentes protocolos, así como la evaluación de indicadores tempranos de riesgo gestacional resultará de suma importancia en la clínica reproductiva diaria.

El objetivo de este capítulo fue de evaluar el efecto farmacológico del CLO y ALI para interrumpir la gestación temprana en felinos, estudiar los cambios ultrasonográficos durante el TRT, y evaluar la fertilidad postratamiento.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la administración de CLO y ALI permitía interrumpir la gestación temprana en felinos, sin la ocurrencia de efectos colaterales o con la aparición de mínimos signos asociados al TRT, sin afectar la fertilidad de la hembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 30 gatas, de raza mestiza, de entre 24 y 36 meses de edad, sanas, con un peso entre 3 a 4 kg, y 4 gatos mestizos, sanos, con un peso entre 3 a 5 kg.

Todos los animales fueron alojados individualmente en jaulas de acero. Los gatos recibieron alimento comercial (Fit 32[®]; Royal Canin, Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron albergados en una habitación acondicionada, con temperatura constante a 22°C durante 45 d previos al inicio del experimento. Se utilizó un régimen de luz artificial de 14 h-luz-diaria (fotoperíodo largo) con lámparas incandescentes de 100 W, a fin de obtener la ciclicidad de las hembras (Robledo y col., 2003). Las gatas utilizadas fueron incluidas en un plan de control urbano de la reproducción.

Criterios de inclusión y marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios de inclusión y consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

Diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado (Petersen 1985). Los animales fueron sometidos a un período de aclimatación durante 45 d. Las gatas fueron controladas diariamente mediante citología vaginal y signología conductual del estro. Al tercer día de presentar una citología vaginal correspondiente al celo, las gatas se colocaron junto con el macho y se documentó el primer servicio. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación y ecografía abdominal 20 d posteriores al día del servicio (Zambelli y Prati, 2006). Entre el día 21 y 22 de gestación, los animales fueron asignados en forma aleatoria a uno de tres TRT (Figura 3.2.).

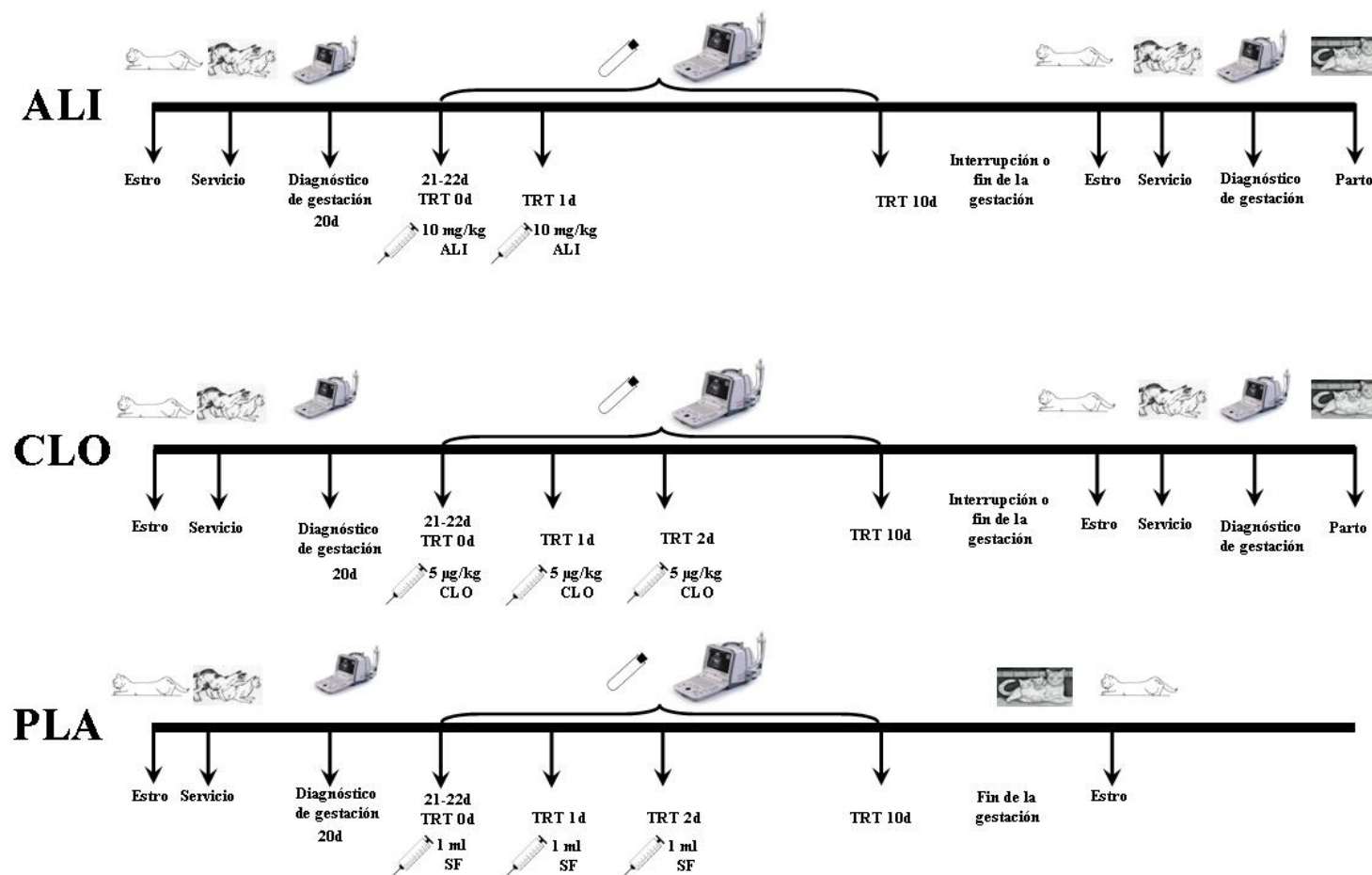


Figura 3.2. Diseño experimental para el estudio de la interrupción de la gestación de gatas mediante la administración de PLA (1 mL de solución fisiológica sc), CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación.

Las gatas asignadas al primer TRT recibieron 10 mg/kg/sc de ALI (Alizin[®], Virbac, Germany, ALI n= 10) durante dos días consecutivos. Las gatas asignadas al segundo TRT recibieron 5 µg/kg/sc de CLO (Ciclar p.a.[®], Zoovet, Argentina, CLO n= 10) durante tres días consecutivos. Las gatas asignadas al tercer TRT recibieron 1 mL de solución fisiológica sc (placebo 0 mg, PLA, n= 10). En la totalidad de las gatas se tomaron muestras de sangre antes de la administración del TRT (día 0), durante el TRT, y hasta el día 10 de iniciado el TRT. Todas las muestras de sangre fueron extraídas por punción de la vena yugular, centrifugadas y almacenadas a -20° C hasta que las concentraciones de P₄ fueron determinadas por RIA de fase sólida usando I¹²⁵ (Coat-A-Count[®], Progesterona Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto de P₄ (6.8 ng/mL) fue 3.9% y para el pool bajo (0.9 ng/mL) fue 5.4%. Diariamente se registró el estado general de los animales, la imagen citológica vaginal y la presencia de descarga vulvar. El útero fue controlado mediante ultrasonografía transabdominal (Ecógrafo Mindray[™], DP-6600 vet, Nanshan, China, sonda lineal multifrecuencia [5-7,5-10 MHz]) desde el día anterior a la administración de TRT hasta la confirmación de la interrupción o fin de la gestación. Se realizaron los siguientes registros ultrasonográficos:

Se realizaron dos cortes del SG, uno LON y otro TRV. Mediante el uso de imágenes congeladas en el corte LON se registraron dos dimensiones una LON y otra ATP mientras que en corte TRV se registró una sola dimensión TRV (Keats y Siström, 2002; Figura 3.3.).

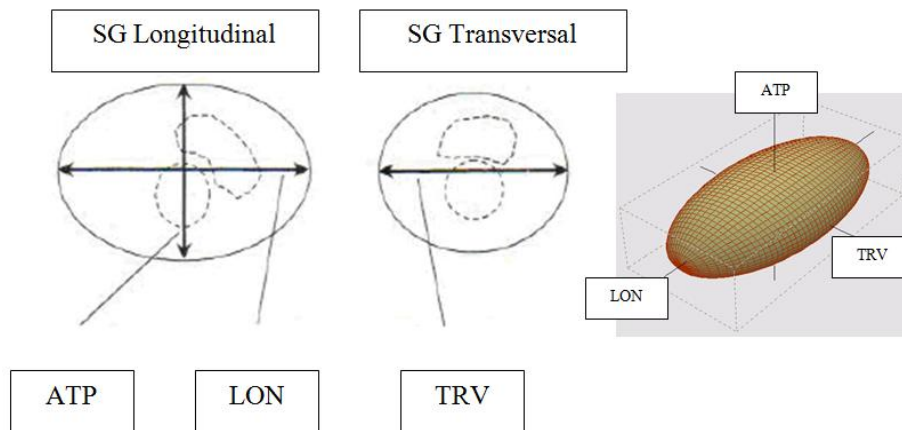


Figura 3.3. Mediciones de los diámetros del SG LON y TRV del útero grávido durante las ecografías (adaptado de Keats y Sistrom, 2002).

Con los registros obtenidos se calculó: 1) VSG; 2) DSG; 3) Medición de la pared del SG; 4) Cambios ecográficos observados en el SG mediante la confección de una escala ad hoc (Tabla 3.1. y 3.2.):

a) PCSG:

0: Sin partículas,

1: Las partículas ocupan hasta el 25% de la cavidad del SG,

2: Las partículas ocupan hasta el 50% de la cavidad del SG,

3: Las partículas ocupan hasta el 75% de la cavidad del SG.

b) RCSG:

0: Normal,



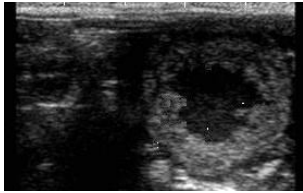

1: Reducción de hasta el 25% de la cavidad del SG,

2: Reducción de hasta el 50% de la cavidad del SG,

3: Reducción de hasta el 75% de la cavidad del SG,

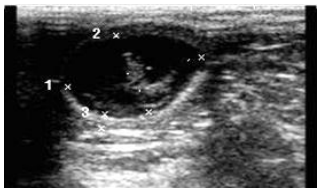



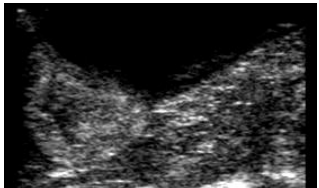
4: Reducción de hasta el 100% de la cavidad del SG.

Tabla 3.1. Cambios ecográficos observados en el SG mediante la confección de una escala ad hoc de las partículas de la cavidad del saco gestacional (PCSG).

Escala	Descripción	Imagen
0	Sin partículas	
1	Las partículas ocupan hasta el 25% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	
2	Las partículas ocupan hasta el 50% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	
3	Las partículas ocupan hasta el 75% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	

⁽¹⁾SG: Saco gestacional

Tabla 3.2. Cambios ecográficos observados en el SG mediante la confección de una escala ad hoc de la reducción de la cavidad del saco gestacional (RCSG).

Escala	Descripción	Imagen
0	Normal	
1	Reducción de hasta el 25% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	
2	Reducción de hasta el 50% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	
3	Reducción de hasta el 75% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	
4	Reducción de hasta el 100% de la cavidad del SG ⁽¹⁾	

⁽¹⁾SG: Saco Gestacional

Luego de la ocurrencia de la interrupción de la gestación o parto se registró el momento en que los animales comenzaron a ciclar nuevamente. Cuando las hembras retomaron la ciclicidad estral, en el segundo celo posterior a la interrupción de la gestación o después, las mismas fueron colocadas con el macho, se registró el servicio, se realizó el diagnóstico de gestación 20 d post servicio y se controló la gestación a fin

de evaluar la fertilidad y posibilidad de desarrollo de una gestación normal luego del interrupción de la gestación inducida con ALI o CLO.

Detección del estadio del ciclo estral

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios de detección del estadio del ciclo estral que en el Capítulo II.

Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico

Durante el periodo de adaptación y periodo de estudio se registró el consumo tanto de agua como de alimento de todos los animales y se realizó un examen físico, el cual incluyó: 1) observación del estado general, 2) registro de la condición corporal (Escala 1 a 5; Kronfeldy col., 1994); 3) medición de temperatura, 4) auscultación torácica, 6) medición de la frecuencia cardíaca, 6) palpación abdominal. El examen físico se realizó diariamente durante los 10 d posteriores a la administración del TRT para luego realizarse semanalmente hasta el parto en los animales en los que no ocurrió interrupción de la gestación. Las variaciones en los parámetros evaluados durante el examen físico fueron registradas.

Examen ultrasonográfico

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios del examen ultrasonográfico que en el Capítulo II.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo (diariamente entre el día 0 al 10 de iniciado el TRT) en el que la unidad

experimental fue la gata. Los datos fueron presentados como cuadrados mínimos medios \pm ES. La significancia fue definida como $P < 0.05$ y una tendencia como $P < 0.10$. Las variables continuas [LON (mm), ATP (mm), TRV (mm), pared del SG (mm), VSG (mm^3) y en el DSG (mm), PCSG, RCSG y las concentraciones séricas de P_4 (ng/mL)] se analizaron como mediciones repetidas en el tiempo mediante el uso de PROC MIXED de SAS[®] 9.1 (SAS, 2003). El modelo incluyó los efectos aleatorios de la gata y los efectos fijos del tiempo (día de TRT), del TRT (ALI vs. CLO vs. PLA) y la interacción tiempo por TRT. Además los efectos fijos se evaluaron con un contraste polinomial (lineal, cuadrático y cúbico) (Petersen, 1985). La duración de la gestación y el intervalo fin de gestación - estro fueron analizadas mediante análisis de varianza con el PROC GLM SAS[®] 9.1. El análisis del ABC se realizó con el Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006).

La interrupción de la gestación (si/no) se evaluó mediante una regresión logística con PROC GENMOD SAS[®] 9.1 empleando una distribución binomial y una función de enlace logit. El modelo logístico incluyó los efectos fijos del TRT y de los días de TRT. El tamaño de camada se evaluó mediante una regresión Poisson con PROC GENMOD SAS[®] 9.1 empleando una distribución Poisson y una función de enlace log. El modelo logístico incluyó los efectos fijos del TRT y de los días de TRT.

RESULTADOS

En todas las gatas asignadas al grupo ALI se produjo interrupción de la gestación (10/10, 100%), mientras que en ninguna de las gatas del grupo CLO (0/10, 0%) y PLA (0/10, 0%) se produjo interrupción de la preñez ($P < 0.0001$).

En la totalidad de las gatas del grupo ALI se observó que desde el inicio de la administración de ALI hasta el comienzo de la reabsorción transcurrieron 4.30 ± 0.60 d; sin embargo, en una gata se observaron tres sacos gestacionales, dos de ellos comenzaron a reabsorberse a los 4 d de iniciado el TRT, pero uno de ellos continuó el desarrollo observándose el feto con vida hasta a los 42 d de iniciado el TRT, momento en el cual se registró la muerte del mismo y su posterior expulsión. Todos los animales presentaron una leve descarga vaginal mucohemorrágica a los 7.42 ± 0.92 d de iniciado el TRT.

Todas de las gatas del grupo CLO y PLA llegaron al final de la gestación. El intervalo entre el inicio del TRT y el parto, la duración de la preñez y el tamaño de camada fue similar en el grupo CLO y PLA (43.2 ± 0.60 vs. 43.0 ± 0.60 d, $P > 0.81$; 64.6 ± 0.61 vs. 64.2 ± 0.61 d, $P > 0.65$; 3.7 ± 0.29 vs. 3.2 ± 0.29 , $P > 0.24$). En ambos TRT se produjo el nacimiento de crías sanas, obteniéndose el 100% de destete.

El número de SG al inicio del TRT fue similar en los grupos ALI, CLO y PLA (2.70 ± 0.33 , 3.30 ± 0.33 y 3.00 ± 0.33 , $P > 0.45$; respectivamente). Los datos obtenidos en la evaluación ultrasonográfica mostraron que al inicio del TRT (día 0) no se observaron diferencias significativas en las mediciones del SG entre los diferentes grupos (LON [$P > 0.85$], ATP [$P > 0.54$], TRV [$P > 0.17$], VSG [$P > 0.24$], DSG [$P > 0.07$] y pared del SG [$P > 0.31$]). Sin embargo cuando se compararon las medidas obtenidas en el grupo CLO y PLA con las obtenidas en el grupo ALI durante los primeros 10 d del estudio, se observaron diferencias significativas en LON, ATP, TRV, VSG y DSG, siendo significativamente menores las mediciones del grupo ALI (interacción de TRT x día del TRT, $P < 0.0001$). En todas las gatas del grupo ALI, las mediciones del SG no se incrementaron después del TRT; en contraposición en las gatas del grupo CLO y PLA las mediciones del SG aumentaron progresivamente durante el mencionado periodo

(Figura 3.4. y 3.5.). Durante la evaluación ultrasonográfica diaria, no se observaron diferencias significativas en la pared del SG entre las gatas del grupo CLO y PLA (día 0-10), sin embargo la pared del SG del grupo ALI fue más gruesa que las del grupo CLO y PLA ($P < 0.001$; Figura 3.5.).

Los datos obtenidos en los registros ultrasonográficos del SG permitieron detectar cambios relacionados con interrupción temprana de la gestación.

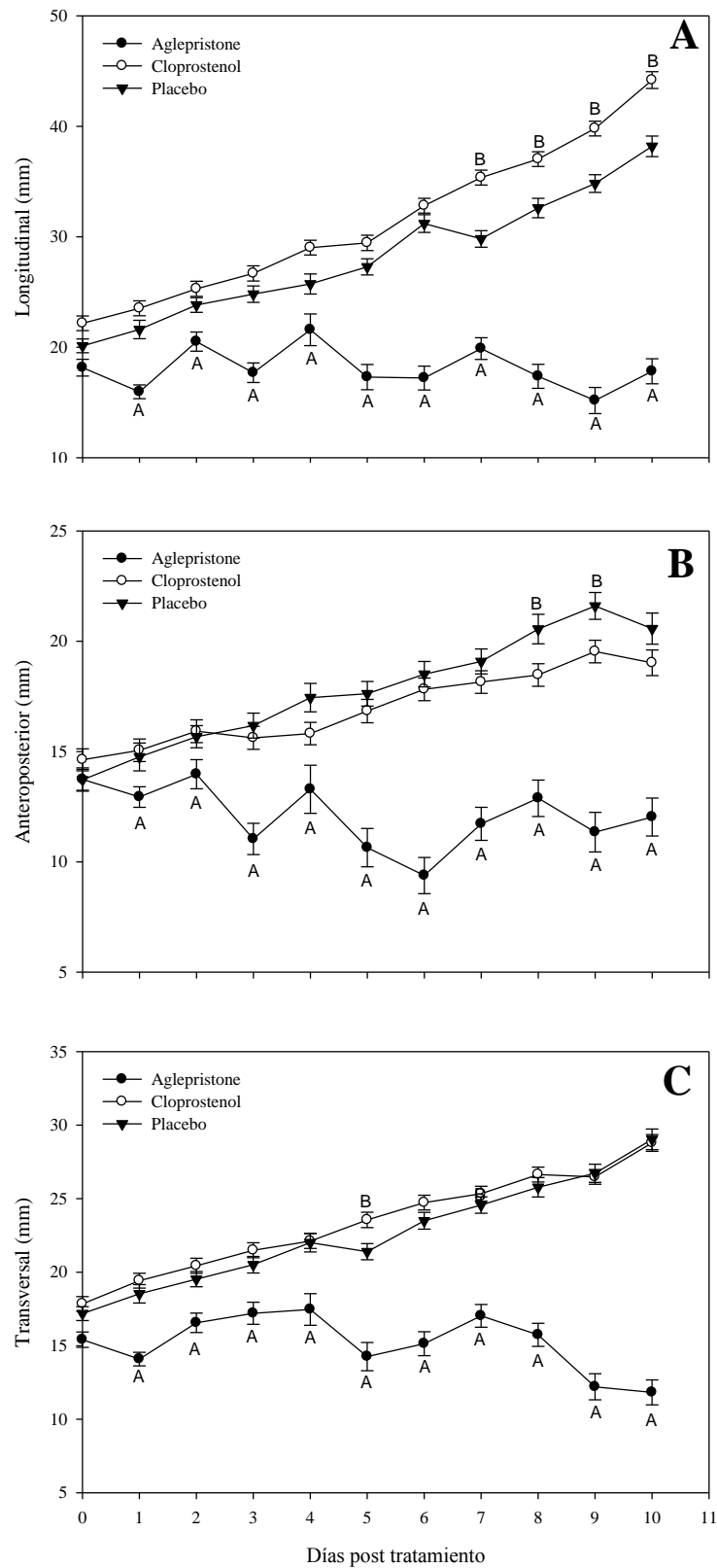


Figura 3.4. Cuadrados medios mínimos y ES de las dimensiones: LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG durante el TRT con PLA, CLO (5 μ g/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación. Superíndices difieren a $P < 0.05$.

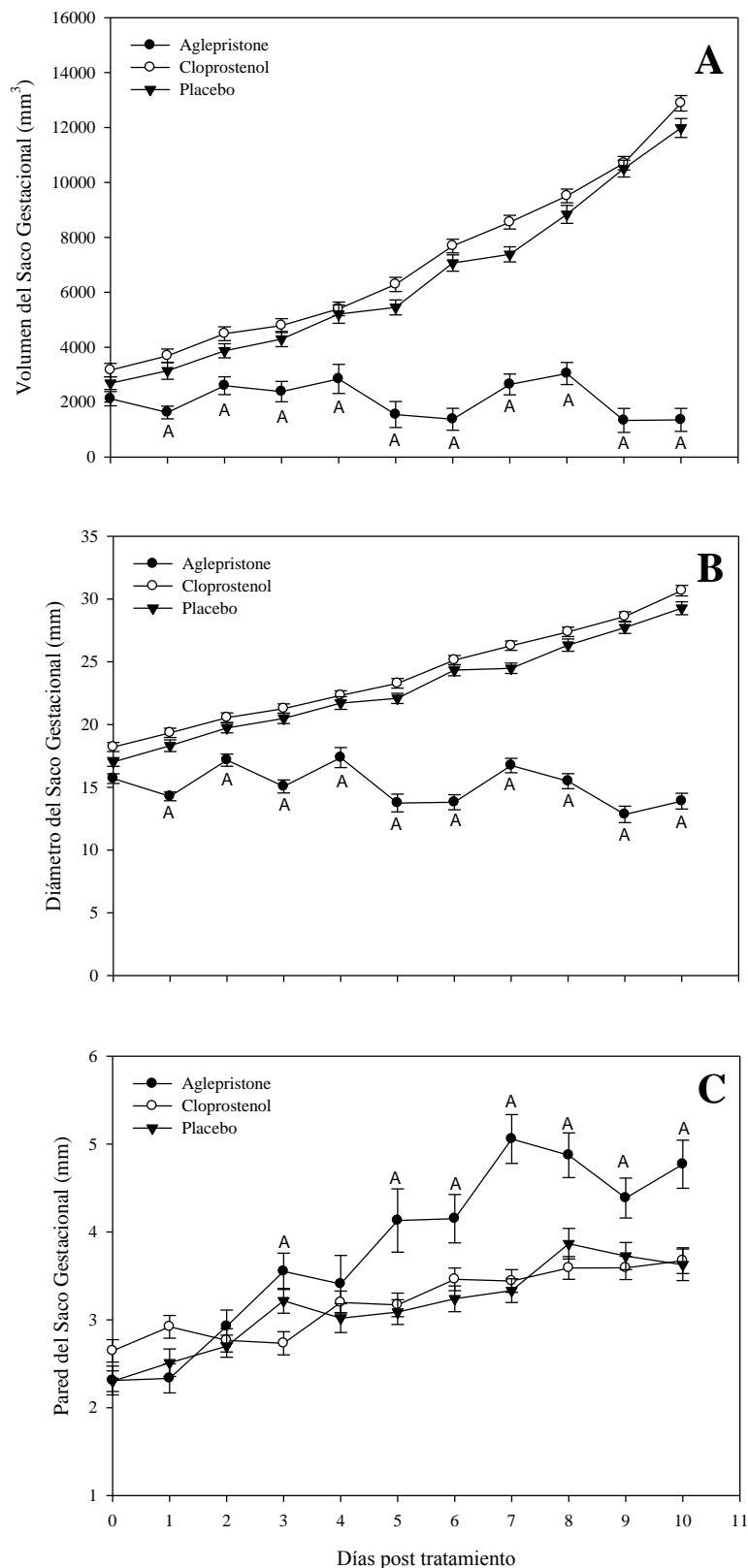


Figura 3.5. Cuadrados medios mínimos y ES del VSG (mm³, A) DSG (mm, B) pared del SG (mm, C) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación. Superíndices difieren a P<0.05.

La evaluación ultrasonográfica de los SG mostró cambios en las PCSG y en la RCSG. Al inicio del TRT (día 0) no se observaron diferencias significativas entre la presencia de PCSG y la RCSG al comparar los diferentes grupos. Sin embargo, las PCSG y la RCSG fue mayor en las gatas del grupo ALI en comparación de las gatas CLO y PLA (interacción de TRT x día de TRT, $P<0.0001$; Figura 3.6.). Los contrastes polinomiales mostraron un efecto cuadrático del ALI sobre las PCSG ($P<0.0001$) y un efecto cúbico del ALI sobre la RCSG ($P<0.032$).

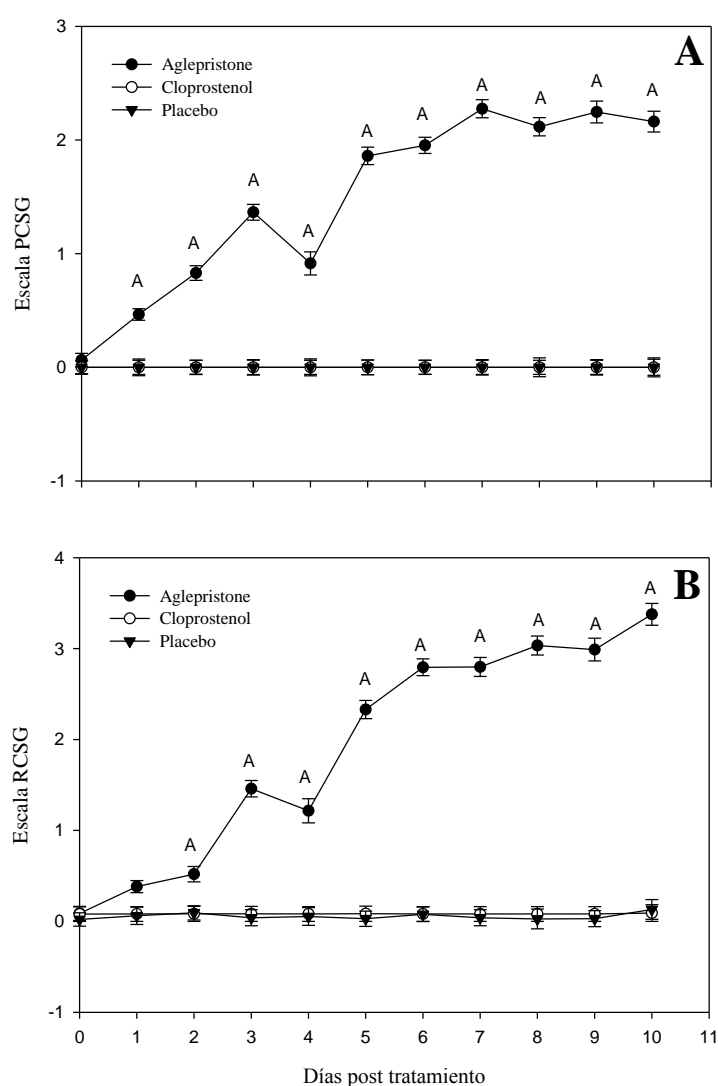


Figura 3.6. Cuadrados medios mínimos y ES de PCSG (A) y RCSG (B) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación. Superíndices difieren a $P<0.05$.

Al analizar las concentraciones séricas de P_4 de las muestras obtenidas no se observaron diferencias significativas al inicio del TRT (día 0) entre el grupo ALI, CLO y PLA (22.92 ± 2.41 , 23.4 ± 2.41 y 29.4 ± 2.54 ng/mL, $P > 0.14$; respectivamente). En contraposición al finalizar el TRT con ALI y CLO pudo observarse que las concentraciones de P_4 de ambos grupos de gatas eran significativamente diferentes a las concentraciones de P_4 de las hembras del grupo PLA (interacción de TRT x día de TRT, $P < 0.0001$). La concentración de P_4 en las gatas del grupo ALI comienza a ascender luego del inicio del TRT. En contraposición en el grupo CLO desciende luego de iniciado el TRT hasta el día 3, momento en el cual comienza a ascender. Desde el día 1 al 7, las hembras del grupo ALI y PLA presentan concentraciones de P_4 similares entre sí y diferentes a las gatas del grupo CLO (interacción de TRT x día de TRT, $P < 0.05$). Sin embargo cuando se compararon las concentraciones de P_4 en las gatas del grupo ALI, CLO y PLA el día 6, las mismas fueron significativamente diferentes (41.01 ± 3.83 , 19.4 ± 3.52 y 29.13 ± 3.61 ng/mL, $P > 0.0005$; respectivamente). Al comparar las concentraciones de P_4 al día 9 de iniciado el TRT se observa que no hay diferencias significativas entre las gatas del grupo ALI, CLO y PLA ($P > 0.73$; Figura 3.7.).

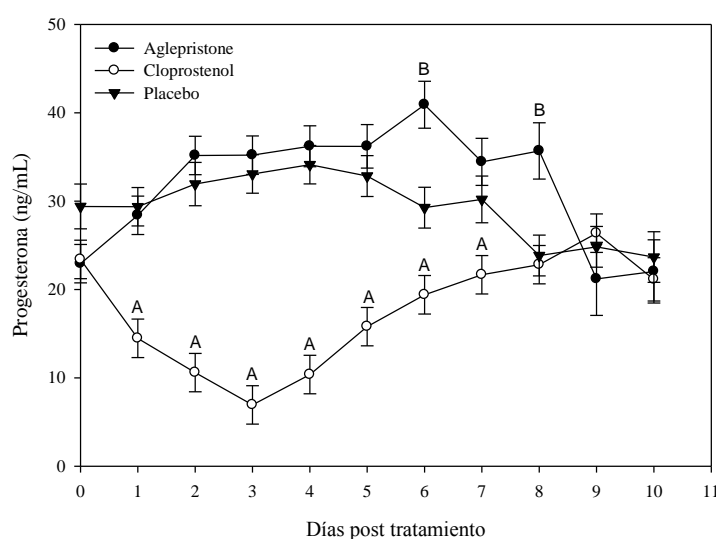


Figura 3.7. Cuadrados medios mínimos y ES de P_4 (ng/mL) durante el TRT con PLA, CLO ($5\mu\text{g/kg}$, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg , dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación. Superíndices difieren a $P < 0.05$.

El ABC de la concentración de P_4 fue menor en el grupo CLO que en el grupo ALI y PLA durante los primeros 5 d postratamiento (61.96 ± 13.72 ng d/mL vs. 156.99 ± 14.47 ng d/mL, $P < 0.001$). Por el contrario, el ABC de la concentración de P_4 fue similar entre el grupo ALI y PLA durante el mismo periodo (166.06 ± 14.47 ng d/mL vs. 147.92 ± 14.47 ng d/mL, $P > 0.38$).

El ABC de la concentración de P_4 fue menor en el grupo CLO que en el grupo ALI y PLA durante los días 5-8 postratamiento (60.36 ± 8.93 ng d/mL vs. 121.28 ± 13.14 ng d/mL, $P < 0.001$). El ABC de la concentración de P_4 fue superior en el grupo ALI que en el grupo PLA durante el mismo periodo (156.16 ± 16.31 ng d/mL vs. 86.41 ± 9.98 ng d/mL, $P < 0.001$).

El intervalo fin de gestación - estro fue similar en las gatas ALI, CLO y PLA (62.8 ± 8.69 , 49.0 ± 8.69 , 57.8 ± 8.69 d, $P > 0.53$; respectivamente). La totalidad de las gatas tratadas con ALI y CLO quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento. Se realizaron controles ultrasonográficos semanales que permitieron comprobar un desarrollo embrionario y fetal normal. Los partos fueron eutócicos en todos los animales. La duración de la gestación y el tamaño de camada fue similar en el grupo ALI y CLO (64.8 ± 0.62 vs. 65.0 ± 0.62 d, $P > 0.82$; 2.8 ± 0.31 vs. 3.3 ± 0.31 , $P > 0.27$). En ambos TRT se produjo el nacimiento de crías sanas, obteniéndose el 100% de destete.

Ninguno de los animales del grupo ALI y PLA presentó alteraciones detectables en los exámenes físicos realizados durante el estudio. Diez a quince minutos luego de la administración de la droga se observaron algunos efectos colaterales (vómitos, diarrea, decaimiento, disminución de la ingesta de alimento, vocalizaciones y taquipnea) de grado leve en las gatas del grupo CLO.

DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos, pudimos observar que el ALI permitió interrumpir la gestación temprana en el 100% de las gatas tratadas. Nuestros hallazgos concuerdan con los trabajos realizados por Georgiev y Wehrend (2006; 2008) quienes lograron interrumpir la gestación en el 87% y 100% de las gatas tratadas, utilizando la misma dosis de ALI al día 25 y 26 de gestación (Georgiev y Wehrend, 2006; Georgiev y Wehrend, 2008). En concordancia con estos resultados Goericke-Pesch (2010) utilizó ALI al día 5 y 6 postservicio registrando un 0% (11/11) de gestaciones ocurridas. Si bien el autor concluye que ALI fue efectivo para prevenir la preñez en las gatas estudiadas no pudo diagnosticarse la ocurrencia de fecundación y desarrollo embrionario, por lo cual podría establecerse la hipótesis de la prevención de la nidación mediante ALI (Goericke-Pesch y col., 2010). Teniendo en cuenta lo anteriormente enunciado nuestro trabajo sería el primero en utilizar ALI para interrumpir gestaciones de tempranas (21-22 d) luego de ser las mismas confirmada por ultrasonografía.

En nuestro estudio en las gatas del grupo ALI el intervalo entre el inicio de TRT y comienzo de la reabsorción fue de 4.30 ± 0.60 d, presentando como única signología clínica una leve descarga vaginal mucohemorrágica a los 7.42 ± 0.92 d de iniciado el TRT. En concordancia Georgiev y Wehrend (2006) comunicaron que las gatas que respondieron al TRT abortaron entre 5-9 d de iniciado el TRT, observando descarga vulvar hemorrágica a los 5 ± 1 d de iniciado el mismo. Más tarde, Georgiev y Wehrend (2008) comprobaron que la descarga vulvar hemorrágica era resultado del daño de las venas uterinas debido al desprendimiento útero-placentario, lo que genera hemorragia intersticial con la subsecuente extravasación de sangre al lumen uterino (Georgiev y Wehrend, 2008).

En nuestro estudio, una de las gatas del grupo ALI, abortó un feto 38 d después de lo observado en el resto de los animales, un resultado similar obtuvo Georgiev y Wehrend (2006), donde una gata abortó a los 20 d de iniciado el TRT. Estos resultados muestran que algunos fetos logran sobrevivir más tiempo a la privación de P_4 causada por ALI (Georgiev y Wehrend, 2006).

En contraposición a nuestra hipótesis, el CLO no resultó efectivo (0/10, 0%) para interrumpir la preñez temprana en las hembras felinas. Este hecho podría estar relacionado con la resistencia del CL al efecto luteolítico en el primer tercio de la gestación, lo cual permitiría la continuación de la gestación y el nacimiento de crías sanas a término (Felman y Nelson, 2000). En el trabajo realizado por Onclin y Verstegen (1997) se logró interrumpir la gestación en el 100% (5/5) de las gatas utilizando la combinación de un agonista dopaminérgico, CAB, junto con una PGF sintética, CLO, al día 30 de gestación. Las diferencias encontradas en el porcentaje de interrupción de la gestación registrados entre el mencionado trabajo y nuestro estudio podrían relacionarse con la EG en la cual se implementó el TRT, así como también a la utilización de CAB en combinación con el CLO. Algunos estudios indicarían que el CL no necesita factores luteotróficos durante los primeros 20 d de vida mientras que al día 30 la PRL es uno de los principales factores luteotróficos que permiten el mantenimiento del CL (Johnston y col., 2001; Verstegen, 1998). La CAB, al disminuir la concentración de PRL sérica, evitaría la acción luteotrófica de esta hormona sobre el CL volviéndolo más sensible a la acción luteolítica del CLO.

Todas las gatas del grupo PLA presentaron un desarrollo embrionario-fetal normal y parto eutócico, produciéndose el nacimiento de crías sanas y obteniéndose el 100% de destete. Nuestros resultados concuerdan con los comunicados por Georgiev y

Wehrend (2006) quienes obtuvieron un desarrollo gestacional normal y un tamaño de camada de 3.3 ± 1.1 crías.

El seguimiento ultrasonográfico durante la gestación brinda la posibilidad de apreciar la morfología de los SG, VSG y DSG, movimientos fetales y evaluación de latidos cardíacos estimando así la viabilidad embrionaria-fetal y valorando el riesgo de pérdida gestacional (Nyland and Matton 2002; Breukelman y col., 2005; Keats and Siström 2002; Zambelli 2006). Si bien algunos autores utilizaron la ultrasonografía para evaluar la eficacia de ALI en la gestación temprana (Georgiev y Wehrend 2006; Georgiev y Wehrend 2008) en ningún caso se comunicaron mediciones del SG registrándose sólo la ocurrencia de la interrupción de la gestación. Los datos obtenidos en los registros ultrasonográficos de las mediciones realizadas a los SG (LON, ATP, TRV, VSG, DSG y pared del SG) mostraron diferencias entre los grupos permitiendo detectar cambios relacionados con interrupción temprana de la gestación y evaluar la ocurrencia o no de una gestación normal. Así mismo pudimos observar la ocurrencia de diferencias en las PCSG y la RCSG obtenidos mediante evaluación ultrasonográfica e identificar cambios relacionados con interrupción de la gestación temprana. Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran que cambios ultrasonográficos del SG permitirían estimar en forma temprana el riesgo de pérdida gestacional en felinos.

Al analizar las concentraciones de P_4 de las gatas del grupo ALI pudimos observar que dichos niveles comienzan a ascender luego de iniciado el TRT. Es así que las concentraciones de P_4 el día 6 fueron significativamente diferentes en las gatas del grupo ALI en comparación a las hembras del grupo CLO y PLA. Estos resultados se correlacionan con los hallazgos de Georgiev y Wehrend (2006) quienes observaron un incremento de los niveles séricos de P_4 a los 6 d de iniciado el TRT, para luego producirse un descenso, y alcanzar concentraciones semejantes a las gatas control a los

15 d de iniciado el TRT. En contraposición Georgiev y Wehrend (2008) no observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de P_4 entre las gatas tratadas y controles en ningún momento del TRT (Georgiev y Wehrend, 2008). Así mismo Fieni y col. (2006) comunicaron un incremento de los niveles de P_4 plasmáticos a las 24 h de iniciado el TRT, observando el mismo efecto postratamiento que el observado en nuestro trabajo (Fieni y col., 2006).

Shille y Stabenfeldt (1979) utilizaron PGF en gatas que presentaban entre 21 y 25 d de pseudopreñez, ocasionando disminución la concentración de P_4 sérica y consecuente depresión de la función lútea luego de iniciado el TRT, obteniendo valores basales de P_4 entre los 5 y 11 d de finalizado el TRT (Shille y Stabenfeldt, 1979). Estos resultados se correlacionan con nuestros hallazgos en las gatas que fueron tratadas con CLO, observando que la P_4 sérica descendió luego de iniciado el TRT, evidenciándose diferencias significativas al comparar las concentraciones séricas de P_4 con el grupo ALI y PLA. Los niveles de P_4 continuaron descendiendo sin llegar a concentraciones basales. Sin embargo a partir del día 4 de iniciado el TRT dichos niveles comenzaron a ascender, para alcanzar concentraciones semejantes a las gatas PLA a los 8 d posterior al inicio del TRT.

En nuestro estudio pudimos observar que durante los primeros 5 d posteriores al TRT, se produjo una reducción del 60% de la concentración de P_4 en el grupo CLO comparado con el grupo ALI y PLA. Durante el periodo del día 5 al 8 posteriores al TRT, se produjo una reducción del 31% de la concentración de P_4 en el grupo CLO comparado con el grupo PLA y un aumento del 80% de la concentración de P_4 en el grupo ALI comparado con el grupo PLA.

La PGF ha sido utilizada para inducir la luteólisis en varias especies en las cuales la única fuente de P_4 es el CL. La administración de $PGF_{2\alpha}$ en gatas que

presentaban 33 d de preñez indujo la lisis del CL y aborto, observando un descenso de la concentración de P_4 plasmática a niveles basales a las 24 h de iniciado el TRT (Verstegen y col, 1993). Si bien en nuestro trabajo los niveles de P_4 sérica comenzaron a descender a las 24 h de iniciado el TRT, en contraposición a lo comunicado por Verstegen y col. (1993), en ninguna de nuestras gatas se observaron concentraciones basales de P_4 . Al analizar las concentraciones séricas de P_4 pudimos determinar que ocurrió un descenso de los niveles de P_4 , no obstante más tarde los valores de P_4 ascendieron nuevamente, mostrando la recuperación de la función lútea, lo cual permitió que la gestación llegara a término sin afectar el desarrollo embrionario-fetal. Si bien en nuestro trabajo se administró una PG sintética, los resultados obtenidos concuerdan con los comunicados por Nachreiner y Marple (1974) quienes observaron que la administración de PG natural en gatas que presentaban menos de 40 d de gestación no produjo interrupción de la preñez (Nachreiner y Marple, 1974).

Onclin y Verstegen (1997) administraron CAB en combinación con CLO en gatas que presentaban 30 d de gestación, produciéndose un descenso de la concentración de P_4 plasmática en forma rápida y constante ocurriendo el aborto en todas las hembras tratadas (Onclin y Verstegen, 1997). Resultados similares obtuvieron Erünał-Maral y col. (2004), quienes utilizaron CAB en combinación con alfaprostol entre los 25 y 40 d de gestación, logrando provocar aborto en todas las gatas tratadas. Si bien se ha comunicado que protocolos combinados de CAB con análogos de PGF, han sido efectivos para inducir aborto, no existen comunicaciones sobre la administración de PG sintética para interrumpir la preñez temprana en las gatas (Erünał-Maral y col., 2004).

Recientemente Braun y col. (2012) pudieron detectar P_4 en el tejido placentario (1.2-5 pg/mL de tejido) entre los 21 y 31 d de gestación, confirmando la existencia de una fuente adicional de P_4 capaz de mantener la gestación en la gata (Braun y col., 2012). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Siemieniuch y col. (2012) quienes comunicaron que la concentración plasmática de P_4 fue numéricamente superior en las gatas preñadas en comparación con las pseudopreñadas. Al analizar la concentración de P_4 placentaria se pudo determinar que la misma sería dependiente de la EG, obteniendo la mayor concentración en la etapa tardía, en comparación con la temprana o media. Estos resultados indicarían que la placenta es una fuente adicional de P_4 en gatas gestantes, pudiendo ser considerada como un órgano endocrino capaz de contribuir con el mantenimiento de la gestación en la gata (Siemieniuch y col., 2012). Si bien dichos autores pudieron detectar niveles de P_4 en tejido placentario, las concentraciones de P_4 placentaria y plasmática fueron determinadas por ELISA, a diferencia de nuestro trabajo en el cual la determinación hormonal fue realizada por RIA. Nagy y col. (1998) realizaron un estudio en yeguas en el cual compararon la determinación de la concentración plasmática de P_4 mediante ELISA y RIA. En dicho estudio pudieron comprobar que ambas técnicas permiten detectar niveles de P_4 . Sin embargo, los valores obtenidos mediante ELISA son mayores que los valores obtenidos mediante RIA (Nagy y col., 1998). Estos hallazgos podrían relacionarse con nuestros resultados, en los cuales pudo observarse que las gatas tratadas con CLO presentaron un descenso de la concentración sérica de P_4 postadministración de la droga, sin llegar a valores basales. Estos hallazgos podrían indicar que la placenta produce P_4 , pero la hormona producida no se detectaría por la técnica de RIA. Es así que la P_4 placentaria permitiría mantener los niveles séricos de P_4 hasta que el CL pueda volver a secretar

cantidades adecuadas para continuar con la gestación, y de esta forma lograr un desarrollo embrionario-fetal normal.

Las fuentes de P_4 así como la importancia de los órganos secretores de esta hormona varían entre las especies animales. En las gatas pseudopreñadas el CL regresa por envejecimiento, sin embargo en las gatas preñadas el CL se mantiene durante toda la gestación y la P_4 placentaria es considerada una fuente adicional, la cual contribuye al mantenimiento de la gestación.

En nuestro trabajo todas las gatas tratadas retornaron al estro luego del TRT. En ninguna de las hembras del grupo ALI y CLO se vio afectada la fertilidad. Todas las hembras quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento, se produjo un desarrollo embrionario-fetal normal y el parto fue eutócico. Todas las hembras parieron crías sanas, obteniéndose el 100% de destete. Resultados similares fueron comunicados por Fieni y col. (2006), quienes observaron que todas las gatas tratadas retornaron al estro, un 77% de los animales quedó preñado en el celo posterior al aborto y un 10% más en el segundo celo (Fieni y col., 2006). En concordancia la fertilidad de las gatas no se vio afectada luego del TRT combinado con CAB y CLO (Onclin y Verstegen, 1997). Sin embargo solo el 33% de las gatas quedaron preñadas luego de utilizar un TRT combinado con CAB y alfaprostol (Erüinal-Maral et al. 2004).

Se ha demostrado que las PG sintéticas son más potentes que la PG natural. En relación a la potencia, la dosis recomendada para la PG sintética es menor que la PG natural, y además se ha observado que se reducen los efectos colaterales (Wanke y col., 2002). En nuestro trabajo las gatas tratadas con CLO presentaron efectos colaterales de grado leve, los cuales fueron los comunicados previamente en asociación a la administración de prostaglandinas (Wanke y col., 2002). Aunque algunos efectos

secundarios observados después de la administración del CLO fueron leves y de corta duración, se ha informado de que los efectos secundarios de la PG dependen de la dosis y se ha comunicado en la perra que los mismos disminuyen con la administración de dosis repetidas de la droga. Se recomienda comenzar con dosis bajas y lentamente aumentar la dosis hasta llegar a la dosis seleccionada después de 2-3 d disminuyendo así los efectos colaterales asociados a la PG (Verstegen y col. 2008). Esta recomendación podría ser utilizada para el uso de CLO en futuros estudios con el fin de reducir los efectos secundarios observados en las gatas. En contraposición no se evidenciaron efectos colaterales en ninguno de los animales tratados con ALI, dicha observación concuerda con los experimentos realizados por Georgiev y Wehrend (2006; 2008).

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que el CLO no resultó efectivo, pero el ALI sí resultó efectivo para interrumpir la gestación en las gatas entre 21 y 22 d de preñez. Las gatas tratadas con ALI no presentaron efectos colaterales, en contraposición las hembras CLO presentaron efectos colaterales de grado leve. Así mismo los datos obtenidos en los registros ultrasonográficos de las mediciones realizadas a los SG mostraron diferencias entre los grupos permitiendo detectar cambios relacionados con interrupción temprana de la gestación. Estos hallazgos muestran que el seguimiento ultrasonográfico durante el TRT permitió evaluar la ocurrencia o no de una gestación normal.

Los resultados obtenidos muestran que la administración de ALI y CLO durante la gestación temprana en la gata permiten conservar la fertilidad postratamiento, por tal motivo dichas drogas pueden ser usadas sin poner en riesgo la salud reproductiva de los animales tratados.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FARMACOLÓGICA DEL CLOPROSTENOL Y AGLEPRISTONE PARA INTERRUMPIR LA GESTACIÓN MEDIA EN FELINOS

INTRODUCCIÓN

El control de la reproducción en la gata se presenta como un constante desafío en la clínica reproductiva diaria. Como se ha descrito en los capítulos previos, la P₄ es necesaria para el establecimiento y el mantenimiento de un ambiente uterino adecuado para el desarrollo embrionario y fetal (Verstegen y col., 1997; Wanke y col., 2002).

La síntesis de P₄ implica una serie de vías metabólicas, conocidas como vías esteroidogénicas, en la cual interviene la proteína esteroidogénica reguladora aguda (StAR), la citocromo P450 y la enzima 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa -Δ⁵ -Δ⁴ isomerasa (3β-HSD), las cuales desempeñan funciones esenciales para la obtención de esta hormona (Blanco, 2007).

En células luteales, la StAR actúa como mediadora del transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna. En el interior de la mitocondria el colesterol es hidroxilado por acción de la 20,22-desmolasa, formando un compuesto llamado pregnenolona, la cual sirve de compuesto intermedio en la síntesis de todas las hormonas esteroides. La transformación siguiente consiste en la deshidrogenación e hidroxilación, la cual es catalizada por una enzima que requiere oxígeno molecular y NADPH como coenzima, oxigenasas de función mixta, ligadas a citocromo P450. Por

acción de 3 β -HSD, se oxida el C3; una isomerasa cambia la doble ligadura entre carbonos 5 y 6 a los carbonos 4 y 5, convirtiendo la pregnenolona en P₄ (Blanco, 2007).

La placenta es un órgano transitorio, compuesto por componentes fetales derivados del corion y componentes maternos derivados de la modificación del endometrio (Senger, 2003). La placenta además de ser un órgano de intercambio metabólico, es considerada un órgano endocrino transitorio, debido a que produce hormonas que pueden estimular la función ovárica, mantener la gestación, influir en el crecimiento fetal, estimular la función mamaria así como intervenir en el parto (Senger, 2003).

Las fuentes de P₄ así como la importancia de los órganos secretores de esta hormona varían entre las especies animales. Si bien la P₄ es producida por el CL en la gestación temprana, el rol del mismo varía entre las diferentes especies. En algunas de ellas, como la vaca, la oveja, la yegua y la mujer, el CL no es necesario para mantener la producción de P₄ durante toda la gestación, debido a que la placenta se hace cargo de la producción de dicha hormona (Senger, 2003). En la oveja el CL es responsable de la producción inicial de P₄, sin embargo la placenta comienza a producir P₄ sólo después del día 50 de gestación. En contraposición en otras especies, como la coneja y la cerda la remoción quirúrgica del CL produce interrupción de la gestación sin importar la EG en la que se realice. Si bien las fuentes de P₄ varían según las especies animales, en todas ellas, el CL produce P₄ durante toda la gestación, inclusive en aquellas especies en las cuales la placenta sintetizan dicha hormona pudiendo mantener la gestación (Senger, 2003).

Durante muchos años el CL fue considerado la principal fuente de P₄ durante la gestación en las gatas. Es así que la producción de P₄ placentaria en la gata fue muy

cuestionada, realizándose diversos estudios en relación a este tópico. Una de las primeras comunicaciones afirmó que la secreción de P_4 por el CL era necesaria para mantener la gestación hasta el día 45-50 (Scott, 1970). En contraposición Verstegen y col. (1993) comunicaron que la P_4 sintetizada por el CL era la responsable de mantener la segunda mitad de la gestación, permaneciendo el CL funcional a través de toda la gestación, produciéndose su regresión previo al parto (Verstegen y col., 1993). Tsutsui y col. (2009) continuaron con el estudio sobre el rol de la P_4 para el mantenimiento de la gestación, para ello incluyeron en su estudio gatas a las que se les realizó ovariectomía en diferentes etapas de la preñez, comunicando que el 100% de las gatas tratadas al día 35 de gestación abortó, un 80% abortó a los 40 d de gestación, un 40% abortó a los 45 d de gestación y un 60% abortó a los 50 d de gestación. En todas las gatas, la concentración plasmática de P_4 fue 1-2 ng/mL en el día posterior a la ovariectomía, disminuyendo a menos de 1 ng/mL a partir del segundo día. A su vez pudo determinarse que la concentración de P_4 en sangre venosa de ovario en el momento de ovariectomía disminuía con la etapa de la preñez. La concentración plasmática de P_4 en sangre venosa uterina y periférica fue similar, sin embargo los valores de P_4 en sangre venosa de ovario eran superiores a ambos. Estos resultados sugieren que la P_4 periférica es el resultado de la secreción proveniente del CL. Si bien el mantenimiento de la preñez después del día 45 de gestación no requiere concentraciones elevadas de P_4 en sangre periférica, la placenta podría proporcionar una fuente local de P_4 / progestágenos, la cual no pudo ser detectada en circulación periférica mediante ELISA (Tsutsui y col., 2009).

En un estudio en el cual se compararon los niveles plasmáticos de P_4 en las gatas durante la pseudopreñez y gestación se pudo comprobar que la concentración de P_4 plasmática se incrementó de manera similar en los primeros 10 a 12 d. Sin embargo,

después de este período las gatas gestantes presentaron niveles de P_4 superiores, coincidiendo con el período de implantación, observándose entre gatas preñadas y con pseudopreñez diferencias significativas en la concentración de dicha hormona a partir de 28 d postovulación. Si bien en ambos grupos los niveles de P_4 comenzaron a descender después de este período, en las gatas preñadas la concentración de P_4 siempre fue superior. A partir de dichos resultados Verhage y col. (1976) comunicaron que los niveles elevados de P_4 en las gatas gestantes podrían relacionarse con una síntesis de P_4 placentaria o extragonadal (Verhage y col., 1976).

Malassine y Ferre (1979) realizaron un estudio en el cual evaluaron la actividad enzimática de la 3β -HSD en la placenta de la gata, midiendo la tasa de formación de P_4 a partir de pregnenolona marcada con un isótopo radiactivo. En dicho estudio comunicaron que la actividad enzimática de la 3β -HSD se incrementó a partir del día 28 de gestación, y en gran medida en la última etapa de la gestación correspondiéndose al aumento en peso de la placenta. La menor actividad enzimática total fue observada en el día 62 de gestación, relacionándose con la disminución del peso de la placenta. Estos resultados indican que la producción placentaria de P_4 aumenta significativamente durante la última parte de la gestación, por lo tanto este hallazgo podría explicar el hecho de que la ovariectomía después del día 49 de preñez no produzca interrupción de la gestación (Malassine y Ferre 1979).

Braun y col. (2012) estudiaron las enzimas involucradas en la producción de P_4 , así como también la concentración de dicha hormona a nivel de la placenta felina. Dichos autores comunicaron niveles elevados de la enzima 3β -HSD los cuales se correlacionan con los niveles de P_4 placentaria. Las concentraciones de P_4 y de la enzima 3β -HSD fueron bajas entre los 21 y 31 d de gestación, pero aumentaron entre

los 37 y 50 d de preñez, a partir de ese momento se produjo un descenso de la concentración de P_4 para llegar a niveles basales al día 55 de gestación. Sin embargo observaron que se mantienen elevados los niveles de la enzima 3β -HSD. A partir de los resultados obtenidos concluyeron en que la placenta felina es capaz de producir P_4 (Braun y col., 2012).

Recientemente Siemieniuch y col. (2012) realizaron un estudio en gatas durante diferentes estadios de la pseudopreñez y gestación, en el cual se evaluó la expresión de la StAR y la 3β -HSD a nivel del CL y placenta. Así mismo se realizó la comparación de P_4 a nivel de sangre periférica y placentaria. En el mencionado estudio se pudo determinar que StAR y 3β -HSD se localizaron en las células luteales, durante la etapa temprana, media y tardía de la preñez y pseudopreñez. Al analizar la placenta se pudo determinar que StAR y 3β -HSD se localizaron en células de origen mesenquimal tales como células de la decidua materna durante la etapa media y tardía de la gestación. Cuando se analizaron los niveles de P_4 , pudo observarse que la concentración en plasma fue numéricamente superior en las gatas preñadas en comparación con las pseudopreñadas, obteniendo la mayor concentración durante la etapa media en ambos grupos de gatas. Al analizar la concentración de P_4 placentaria se pudo determinar que la misma parece ser dependiente de la EG, obteniendo la mayor concentración en la etapa tardía, en comparación con la temprana o media. Estos resultados confirman que la placenta es una fuente adicional de P_4 en gatas gestantes, y por lo tanto puede ser considerada como un órgano endocrino capaz de contribuir al mantenimiento de la gestación en la gata (Siemieniuch y col., 2012).

A partir de los estudios antes mencionados, se debe tener en cuenta el estadio de la gestación en el que se administran PG para generar interrupción de la preñez, ya que aparentemente el CL no sería la única fuente de P_4 durante la gestación. Se ha

comunicado que la administración de PG natural resulta efectiva para inducir el aborto en gatas con más de 40 d de gestación, por el contrario en aquellas gatas que presentaban menos de 40 d de gestación no ocurrió aborto (Nachreiner Marple y 1974). Shille y Stabenfeldt (1979) comunicaron que estos resultados pueden deberse a que el aborto se haya producido por un efecto contráctil del útero en presencia de una depresión de la función lútea (Shille y Stabenfeldt 1979). En contraposición, al administrarse PG $F_{2\alpha}$ natural al día 33 de gestación, se generó el aborto con la expulsión de fetos en la totalidad de las gatas tratadas (Verstegen y col., 1993), dichos resultados concuerdan con el estudio realizado por Tsutsui y col. (2009) quienes obtuvieron un 100% de aborto en aquellas gatas a las que se les realizó ovariectomía a los 35 d de gestación (Tsutsui y col., 2009). El uso de agonista dopaminérgico en combinación con un análogo de PGF tal como CLO o alfaprostol ha sido eficaz en los gatos para inducir el aborto durante la gestación media (Onclin y Verstegen, 1997; Erüinal -Maral y col., 2004).

Si bien las PG natural y sintética se utilizan para inducir luteólisis en varias especies en las que la única fuente de P_4 es el CL, se sabe que las PG sintéticas son más potentes que las PG naturales. Según la potencia, la dosis recomendada para la PG sintética es menor que para la PG natural y podría producir mayores efectos secundarios (Wanke y col., 2002).

La eficacia del CLO sin un agonista dopaminérgico no ha sido estudiada todavía. Por lo tanto, el CLO podría ser eficaz para inducir luteólisis en gatas que presentan 35-38 d de gestación.

El efecto de los antiprogestágenos durante la gestación media ha sido poco estudiado en felinos. Existe sólo una comunicación sobre el uso de ALI para interrumpir la preñez en las gatas. En dicho estudio Fieni y col. (2006) administraron ALI en una

dosis de 15 mg/kg/d/sc durante dos días consecutivos entre el día 33 ± 4.2 de preñez obteniendo interrupción de la gestación en el 88.5% de las gatas tratadas. No se han realizado estudios sobre la eficacia de dosis menores de ALI en la gestación media. Es así que la implementación de un protocolo en el cual se reduzca la dosis del ALI durante la gestación media, podría ser una alternativa eficaz para la interrupción de la gestación en esta especie.

Si bien se registra el aborto, en la mayoría de los estudios en los que se utilizan drogas para interrumpir la gestación no se realiza un seguimiento ultrasonográfico sobre el SG ni del embrión durante la aplicación del protocolo abortivo. Sin embargo la ultrasonografía resulta de gran utilidad, ya que permite ver y monitorear a los embriones-fetos, evaluar la viabilidad y valorar el riesgo de pérdida gestacional (Nyland y Mattoon, 2002; Keats y Sistrom, 2002; Zambelli y Prati, 2006).

Históricamente la evaluación de la salud del feto humano se basaba fundamentalmente en el examen clínico de la mujer gestante y mediciones de marcadores indirectos bioquímicos (fosfatasa alcalina placentaria, leucina amino-peptidasa, lactógeno placentario). Sin embargo la ultrasonografía hizo posible un examen detallado del feto al permitir evaluar múltiples actividades biofísicas fetales (Manning, 2010).

El PBF es una escala derivada de la observación de las variables dinámicas discretas fetales. La escala del PBF se determina en el momento de realizar la ecografía obstétrica, generalmente junto con la valoración morfológica del embarazo y la medición de parámetros biométricos. La suma de las puntuaciones de cada variable fetal, dará un resultado a partir del cual se sugiere un protocolo terapéutico (Keats y Sistrom, 2002; Manning, 2010).

Frank Manning describió por primera vez el PBF, al realizar un estudio en mujeres gestantes. En dicho perfil se utilizaron cinco variables biofísicas fetales para predecir la evolución prenatal, utilizando como variables fetales a los movimientos respiratorios, movimientos corporales macroscópicos, tono fetal, FCF reactiva y volumen de líquido amniótico. Este método resultó muy preciso para diferenciar fetos saludables de comprometidos (Keats y Siström, 2002; Ferreiro, 1999; Manning, 2010).

Las variables dinámicas fetales incluidas en el perfil están reguladas por el sistema nervioso central, las cuales se alteran en estado de hipoxia en orden inverso a la madurez cronológica de los centros nerviosos responsables de cada actividad biofísica. Teniendo en cuenta el desarrollo del sistema nervioso central en el feto humano, el área cortex-subcortical es la más precoz en desarrollarse en la vida intrauterina, dicha área se encarga de controlar el tono fetal, y se ha comprobado que es la última variable en desaparecer en el caso de asfixia (Huaman y col., 1995; Ferreiro, 1999).

Durante muchos años el PBF fue utilizado en mujeres gestantes, principalmente en gestaciones de alto riesgo, ya que el objetivo del PBF es estimar la mortalidad y morbilidad perinatal. Esta prueba sencilla y rápida ha permitido reducir los riesgos maternos y perinatales, con la consecuente disminución de la morbimortalidad materna y perinatal (Huaman y col., 1995; Ferreiro, 1999; Manning, 2010).

El desarrollo tecnológico de las últimas décadas ha permitido ampliar las posibilidades de estudio del feto, considerado hoy como paciente por sí mismo. Sin embargo, la evaluación clínica debe ser siempre el punto de partida y constituir la base para la indicación de diferentes métodos complementarios que permitan la aproximación diagnóstica (Huaman y col., 1995; Ferreiro, 1999).

La utilización del PFB en las gatas gestantes, a través del análisis de variables dinámicas semejantes a las utilizadas en la mujer, constituye una metodología prometedora para predecir la morbilidad y mortalidad fetal.

En resumen, el desarrollo de nuevos protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación media con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirá mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros. Conjuntamente la evaluación de la fertilidad posterior a la interrupción de la gestación con diferentes protocolos, así como la evaluación de indicadores de riesgo gestacional resultará de suma importancia en la clínica reproductiva diaria.

El objetivo de este capítulo fue de evaluar el efecto farmacológico del CLO y ALI para interrumpir la gestación media en felinos, estudiar los cambios ultrasonográficos durante el TRT, y evaluar la fertilidad postratamiento.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la administración de CLO y ALI permite interrumpir la gestación media en felinos, sin la ocurrencia de efectos colaterales o con la aparición de mínimos signos asociados al TRT, sin afectar la fertilidad de la hembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 30 gatas, de raza mestiza, de entre 24 y 36 meses de edad, sanas, con un peso entre 3 a 4 kg, y 4 gatos mestizos, sanos, con un peso entre 3 a 5 kg.

Todos los animales fueron alojados individualmente en jaulas de acero. Los gatos recibieron alimento comercial (Fit 32[®]; Royal Canin, Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron albergados en una habitación

acondicionada, con temperatura constante a 22°C durante 45 d previos al inicio del experimento. Se utilizó un régimen de luz artificial de 14 h-luz-diaria (fotoperíodo largo) con lámparas incandescentes de 100 W, a fin de obtener la ciclicidad de las hembras (Robledo y col., 2003). Las gatas utilizadas fueron incluidas en un plan de control urbano de la reproducción.

Criterios de inclusión y marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios de inclusión y consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

Diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado (Petersen 1985). Los animales fueron sometidos a un período de aclimatación durante 45 d (Gimenez y col., 2009). Las gatas fueron controladas diariamente mediante citología vaginal y signología conductual del estro. Al tercer día de presentar una citología vaginal correspondiente al celo, las gatas se colocaron junto con el macho y se documentó el primer servicio. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación y ecografía abdominal 20 d posteriores al día del servicio (Zambelli y Prati, 2006). Entre el día 35 y 38 de gestación, los animales fueron asignados en forma aleatoria a uno de tres TRT (Figura 4.1.).

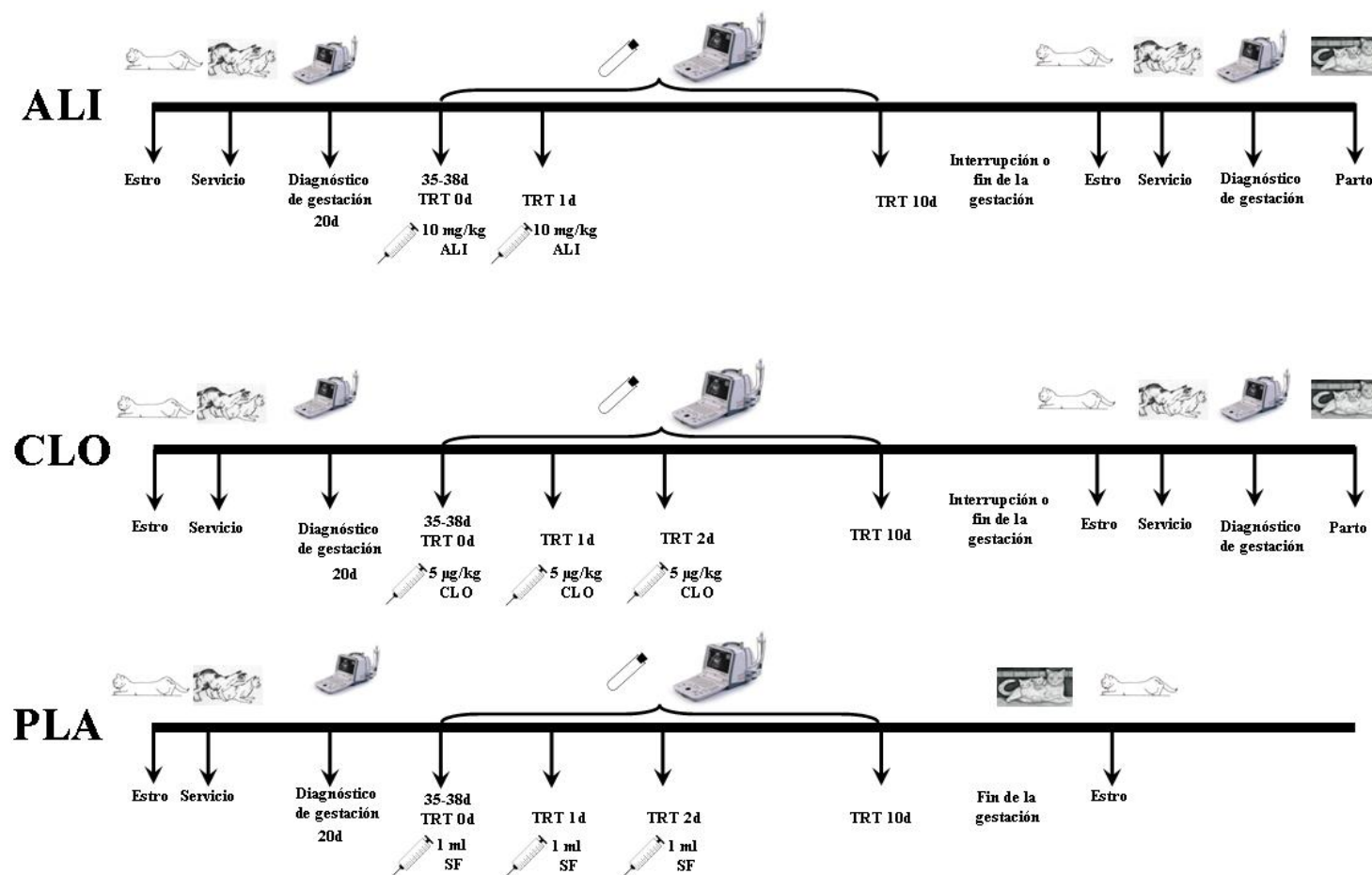


Figura 4.1. Diseño experimental para el estudio de la interrupción de la gestación de gatas mediante la administración de PLA (1 mL de solución fisiológica sc), CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación.

Las gatas asignadas al primer TRT recibieron 10 mg/kg/sc de ALI (Alizin[®], Virbac, Germany, ALI n= 10) durante dos días consecutivos. Las gatas asignadas al segundo TRT recibieron 5 µg/kg/sc de CLO (Ciclar p.a. [®], Zoovet, Argentina, CLO n= 10) durante tres días consecutivos. Las gatas asignadas al tercer TRT recibieron 1 mL de solución fisiológica sc (placebo 0 mg, PLA, n= 10). En la totalidad de las gatas se tomaron muestras de sangre antes de la administración del TRT (día 0), durante el TRT y el día posterior al TRT. En las hembras que se produjo interrupción de la gestación se tomaron muestras de sangre el día del aborto y los dos días siguientes. Mientras que en las gatas en las que no se produjo interrupción de la gestación se tomaron muestras hasta el día 10 de iniciado el TRT. Todas las muestras de sangre fueron extraídas por punción de la vena yugular, centrifugadas y almacenadas a -20° C hasta que las concentraciones de P₄ fueron determinadas por RIA de fase sólida usando I¹²⁵ (Coat-A-Count[®], Progesterona Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intraensayo para el pool alto de P₄ (6.8 ng/mL) fue 4.6% y para el pool bajo (0.8 ng/mL) fue 6.0%. Diariamente se registró el estado general de los animales, la imagen citológica vaginal y la presencia de descarga vulvar. El útero fue controlado mediante ultrasonografía transabdominal (Ecógrafo Mindray[™], DP-6600 vet, Nanshan, China, sonda lineal multifrecuencia [5-7,5-10 MHz]) desde el día anterior a la administración de TRT hasta la confirmación de la interrupción o fin de la gestación. Se realizaron registros ultrasonográficos del SG y fetos.

Con los registros obtenidos del SG se calculó: 1) VSG; 2) DSG; 3) Medición de la pared del SG.

Con los registros obtenidos de los fetos se determinó 1) utilizando imágenes fetales congeladas: a) LCC; b) DT; c) DB. 2) PBF estableciendo una escala ad hoc mediante la relación entre MCF macroscópicos, FCF y VSG. Los MCF macroscópicos

incluyeron movimientos aislados del feto (totales, segmentarios o de rotación) y movimientos de flexión y extensión del tronco y miembros, los cuales fueron contabilizados en 1 min de observación. La FCF se calculó mediante el modo M/B utilizando trazados congelados con calibradores electrónicos y software del ecógrafo Mindray, DP-6600 vet. (Keats y Siström, 2002; Manning y col., 1987; Nyland y Mattoon, 2002; Tabla 4.1.)

Tabla 4.1. Sistema de puntuación del Perfil Biofísico Fetal (PBF)

PBF		
Variable	Hallazgo Normal (Escala=2)	Hallazgo Anormal (Escala=0)
MCF ⁽¹⁾	Mayor o igual a 7 movimientos	Menor a 7 movimientos
FCF ⁽²⁾	Mayor o igual a 220 lpm ⁽⁴⁾	Menor a 220 lpm ⁽⁴⁾
VSG ⁽³⁾	Incremento del VSG	Disminución o mantenimiento del VSG

⁽¹⁾MCF: Movimientos Corporales Fetales, ⁽²⁾FCF: Frecuencia Cardíaca Fetal, ⁽³⁾VSG: Volumen del Saco Gestacional, ⁽⁴⁾lpm: Latidos por minuto.

Luego de la ocurrencia de la interrupción de la gestación o parto se registró el momento en que los animales comenzaron a ciclar nuevamente. Cuando las hembras retomaron la ciclicidad estral, en el segundo celo posterior a la interrupción de la gestación o después, las mismas fueron colocadas con el macho, se registró el servicio, se realizó el diagnóstico de gestación 20 d postservicio y se controló la gestación a fin de evaluar la fertilidad y posibilidad de desarrollo de una gestación normal luego de la interrupción de la gestación inducida con ALI o CLO.

Detección del estadio del ciclo estral

Este experimento se realizó respetando las mismas consideraciones de detección del estadio del ciclo estral que en el Capítulo II.

Control de los animales durante el estudio: observación y examen físico

En este experimento se realizaron las mismas observaciones diarias y examen físico que en el Capítulo III.

Examen ultrasonográfico

En este experimento se realizó el mismo procedimiento respecto al examen ultrasonográfico que en el Capítulo II.

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo (diariamente entre el día 0 al 10 de iniciado el TRT) en el que la unidad experimental fue la gata. Los datos fueron presentados como cuadrados mínimos medios \pm ES. La significancia fue definida como $P < 0.05$ y una tendencia como $P < 0.10$. Las variables continuas [LON (mm), ATP (mm), TRV (mm), pared del SG (mm), VSG (mm^3), DSG (mm), LCC (mm), DB (mm), DT (mm) y las concentraciones séricas de P_4 (ng/mL)] se analizaron como mediciones repetidas en el tiempo mediante el uso de PROC MIXED de SAS[®] 9.1 (SAS, 2003). El modelo incluyó los efectos aleatorios de la gata y los efectos fijos del tiempo (día TRT), del TRT (ALI vs. CLO vs. PLA) y la interacción tiempo por TRT. La duración de la gestación y el intervalo fin de gestación - estro fueron analizadas mediante análisis de varianza con el PROC GLM SAS[®] 9.1. El análisis del ABC se realizó con el Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006).

La interrupción de la gestación (si/no) se evaluó mediante una regresión logística con PROC GENMOD SAS[®] 9.1 empleando una distribución binomial y una función de enlace logit. El modelo logístico incluyó los efectos fijos del TRT y de los días del TRT. El tamaño de camada se evaluó mediante una regresión Poisson con PROC GENMOD SAS[®] 9.1 empleando una distribución Poisson y una función de enlace log. El modelo logístico incluyó los efectos fijos del TRT y de los días del TRT.

RESULTADOS

En todas las gatas asignadas al grupo ALI se produjo aborto (10/10, 100%). En las gatas del grupo CLO se registró aborto en un sólo animal (1/10, 10%). En ninguna de las gatas del grupo PLA (0/10, 0%) se produjo interrupción de la preñez ($P < 0.0001$).

El intervalo entre el inicio del TRT y el aborto en las gatas del grupo ALI fue de 4.1 ± 0.31 d, presentaron una moderada descarga vaginal mucohemorrágica a los 4.0 ± 0.29 d de iniciado el TRT. Mientras que la única gata del grupo CLO que abortó lo hizo a los 5 d de iniciado el TRT, observando una moderada descarga vaginal mucohemorrágica a los 3 d de iniciado el TRT.

Nueve gatas del grupo CLO y la totalidad de las hembras del grupo PLA llegaron al final de la gestación. La duración de la preñez y el tamaño de camada fue similar entre el grupo CLO y PLA (65.0 ± 0.46 vs. 65.2 ± 0.44 d, $P > 0.76$; 3.44 ± 0.41 vs. 3.5 ± 0.39 , $P > 0.93$). En ambos TRT se produjo el nacimiento de crías sanas, obteniéndose el 100% de destete.

Los datos obtenidos en la evaluación ultrasonográfica mostraron que al inicio del TRT (día 0) no se observaron diferencias significativas en las mediciones del SG entre los diferentes grupos (LON [$P > 0.22$], ATP [$P > 0.88$], TRV [$P > 0.11$], pared del SG

[$P>0.12$], VSG [$P>0.28$] y DSG [$P>0.24$]). Sin embargo, en los días subsiguientes (día 2-10) en las gatas del grupo PLA se observó un mayor incremento en las mediciones del SG (LON, ATP, TRV, VSG y DSG) en comparación de las gatas del grupo ALI y CLO (Figura 4.2. y 4.3.). Al evaluar la pared del SG, pudo determinarse que no se observaron diferencias significativas del día 0 al 3 de iniciado el TRT entre los grupos. Sin embargo se observaron diferencias significativas en las gatas del grupo ALI y PLA en comparación de las hembras del grupo CLO, al día 4 de iniciado el TRT ($P>0.05$; Figura 4.3.). Los datos obtenidos en los registros ultrasonográficos del SG permitieron detectar cambios relacionados con interrupción media de la gestación.

Al analizar las mediciones fetales se determinó que al inicio del TRT (día 0) no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (LCC [$P>0.70$], DB [$P>0.06$], DT [$P>0.44$]). En las gatas del grupo ALI no se observaron diferencias significativas en la LCC, el DB y el DT en comparación con las gatas del grupo CLO y PLA del día 1 al 4 de iniciado el TRT. En las gatas del grupo PLA se observó un mayor incremento en las mediciones fetales (LCC, DB y DT) en comparación de las hembras del grupo ALI y CLO (Figura 4.4.).

Durante el seguimiento ultrasonográfico no se observaron diferencias significativas en los MCF y FCF entre los grupos ALI, CLO y PLA ([MCF 1.0 ± 0.33 , 1.1 ± 0.35 , 1.1 ± 0.35 , $P>0.96$], [FCF 1.8 ± 0.16 , 2.0 ± 0.17 , 1.77 ± 0.17 , $P>0.62$]; respectivamente). Resultados similares se obtuvieron en el VSG entre el grupo CLO y PLA (1.5 ± 0.29 vs. 1.7 ± 0.29 $P>0.59$; respectivamente). En contraposición se observaron diferencias significativas en el VSG entre el grupo ALI y PLA (0.8 ± 0.27 vs. 1.77 ± 0.29 , $P>0.02$; respectivamente). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el PFB entre las gatas del grupo ALI, CLO y PLA (3.6 ± 0.46 , 4.6 ± 0.49 , 4.6 ± 0.49 , $P>0.20$; respectivamente).

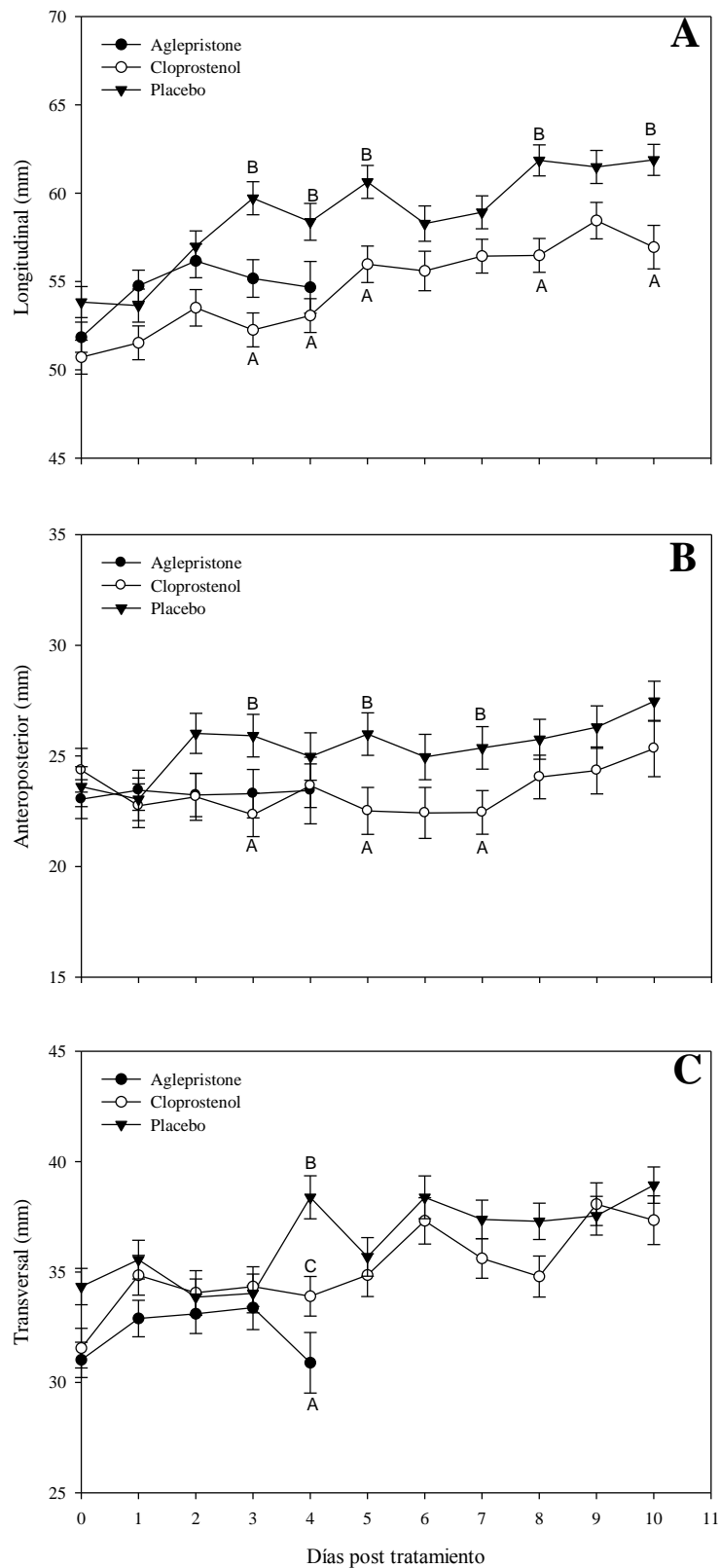


Figura 4.2. Cuadrados medios mínimos y ES de las dimensiones: LON (mm, A), ATP (mm, B) y TRV (mm, C) del SG durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación. Superíndices difieren a $P < 0.05$.

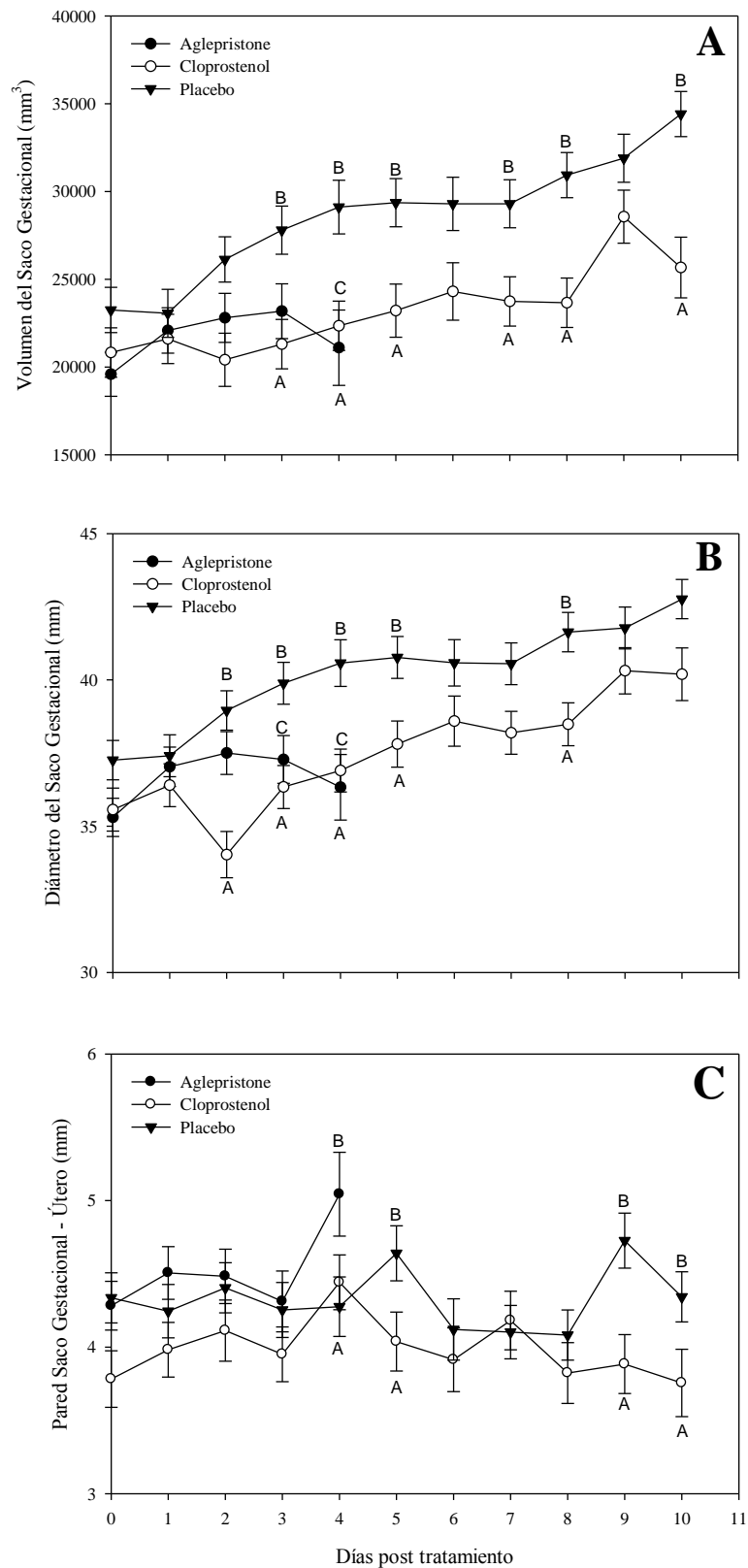


Figura 4.3. Cuadrados medios mínimos y ES del VSG (mm^3 , A) DSG (mm, B) pared del SG (mm, C) durante el TRT con PLA, CLO ($5\mu\text{g/kg}$, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg , dos días consecutivos) a los 21-22 d de gestación. Superíndices difieren a $P < 0.05$.

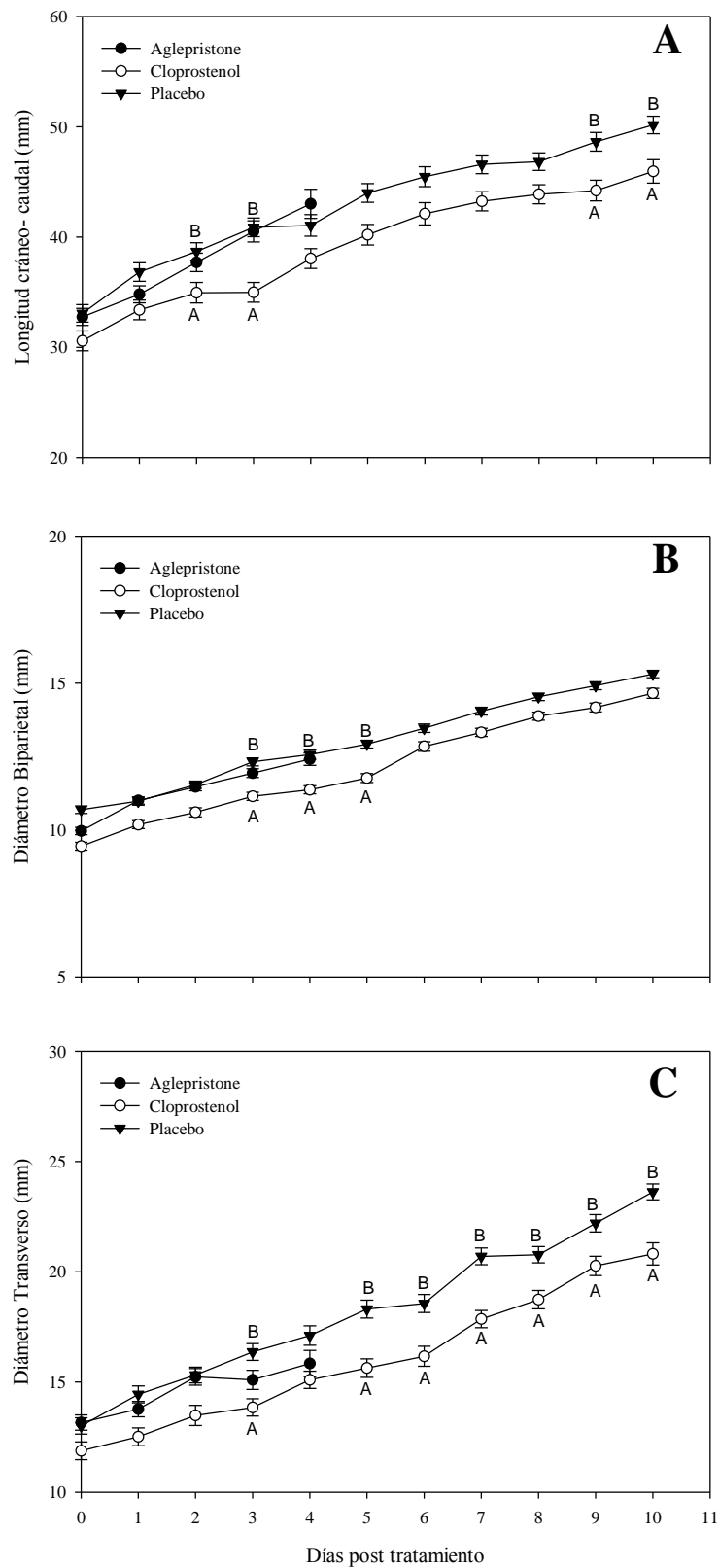


Figura 4.4. Cuadrados medios mínimos y ES del LCC (mm, A), DB (mm, B), DT (mm, C) durante el TRT con PLA, CLO (5 μ g/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación. Superíndices difieren a $P < 0.05$.

Al analizar las concentraciones séricas de P_4 de las muestras obtenidas no se observaron diferencias significativas al inicio del TRT (día 0) entre el grupo ALI, CLO y PLA (32.25 ± 2.8 , 32.2 ± 2.96 y 32.96 ± 2.8 ng/mL, $P > 0.99$; respectivamente). En contraposición al finalizar el TRT con ALI y CLO pudo observarse que las concentraciones de P_4 de ambos grupos de gatas eran significativamente diferentes a las concentraciones de P_4 de las hembras del grupo PLA (interacción TRT-día TRT CLO - ALI vs. PLA $P < 0.0001$). La concentración de P_4 en las gatas del grupo ALI comienza a ascender luego del inicio del TRT. En contraposición en el grupo CLO desciende luego de iniciado el TRT hasta el día 3, momento en el cual comienza a ascender. Se observaron diferencias significativas (día 1 - 5) en las hembras del grupo ALI y CLO en comparación a las gatas PLA. Al comparar las concentraciones de P_4 al día 8 de iniciado el TRT se observa que no hay diferencias significativas entre las gatas del grupo ALI, CLO y PLA ($P > 0.94$; Figura 4.5.)

El ABC de la concentración de P_4 fue menor en el grupo CLO que en el grupo ALI y PLA durante los primeros 5 d posteriores al inicio de los TRT (67.55 ± 19.53 ng d/mL vs. 171.86 ± 18.53 ng d/mL, $P < 0.001$). Mientras que el ABC de la concentración de P_4 fue superior en el grupo ALI que en el grupo PLA durante los primeros 5 d posteriores al inicio de los TRT (207.85 ± 18.53 ng d/mL vs. 135.88 ± 18.53 ng d/mL, $P > 0.01$).

El ABC de la concentración de P_4 fue menor en el grupo CLO que en el grupo ALI y PLA durante los 5-7 d posteriores inicio de los TRT (31.02 ± 7.34 ng d/mL vs. 55.95 ± 7.15 ng d/mL, $P < 0.009$). También el ABC de la concentración de P_4 fue superior en el grupo ALI que en el grupo PLA durante los 5-7 d posteriores al inicio de los TRT (58.63 ± 7.34 ng d/mL vs. 53.28 ± 6.96 ng d/mL, $P < 0.60$).

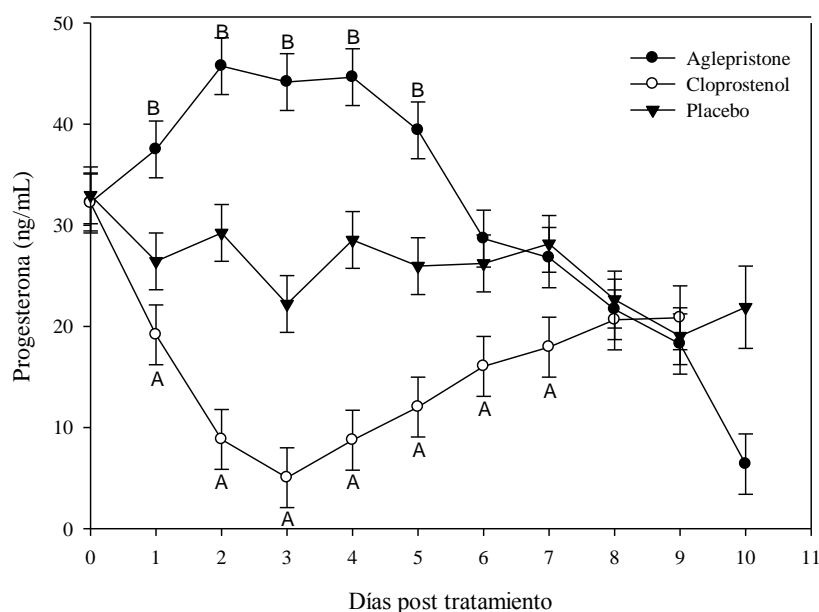


Figura 4.5. Cuadrados medios mínimos y ES de P₄ (ng/mL) durante el TRT con PLA, CLO (5µg/kg, tres días consecutivos) o ALI (10 mg/kg, dos días consecutivos) a los 35-38 d de gestación. Superíndices difieren a P<0.05.

El intervalo fin de gestación - estro fue similar en las gatas ALI, CLO y PLA (34.4±5.84, 40.42±6.98, 43.3±5.84 d, P>0.55; respectivamente). La totalidad de las gatas tratadas con ALI y CLO quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento. Se realizaron controles ultrasonográficos semanales que permitieron comprobar un desarrollo embrionario y fetal normal. Los partos fueron eutócicos en todos los animales. La duración de la gestación y el tamaño de camada fue similar en el grupo ALI y CLO (65.0±0.67 vs. 64.2±0.75 d, P>0.47; 2.6±0.22 vs. 2.5±0.25, P>0.77). En ambos TRT se produjo el nacimiento de crías sanas, obteniéndose el 100% de destete.

Ninguno de los animales del grupo ALI y PLA presentó alteraciones detectables en los exámenes físicos realizados durante el estudio. Diez a quince minutos luego de la administración de la droga se observaron algunos efectos colaterales (náuseas, vómitos, diarrea, decaimiento, disminución de la ingesta de alimento, vocalizaciones y taquipnea) de grado leve en las gatas del grupo CLO.

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestra hipótesis, el ALI permitió interrumpir la gestación media en el 100% de las gatas tratadas. Nuestros hallazgos concuerdan con el trabajo realizado por Fieni y col., (2006) quienes obtuvieron un 88.5% de abortos utilizando 15 mg/kg/sc al día 33.3 ± 4.2 de gestación. Las diferencias encontradas en el porcentaje abortos registrados entre los experimentos podrían relacionarse con la EG en la que se implementó el TRT, la dosis utilizada así como a las diferencias en el número de animales incluidos en cada estudio.

En nuestro estudio, en las gatas del grupo ALI el intervalo entre el inicio de TRT y el aborto fue de 4.1 ± 0.31 d, presentando como única signología clínica una leve descarga vaginal mucohemorrágica a los 4.0 ± 0.29 d de iniciado el TRT. En concordancia con nuestros resultados Fieni y col. (2006) observaron interrupción de la gestación en el 50% de las hembras que abortaron, ocurriendo la misma luego de 3 d de iniciado el TRT. Así mismo se observó descarga vulvar hemorrágica entre el día 0 y 7 de iniciado el TRT.

En contraposición con nuestra hipótesis, el CLO no resultó efectivo para interrumpir la preñez media en las hembras felinas. Este hecho podría estar relacionado con la fuente de P_4 placentaria, la cual permitiría continuar la gestación, produciendo el nacimiento de crías a término, como ocurre en otras especies (vaca, oveja, yegua, mujer), en las cuales el CL es responsable de la producción inicial de P_4 . Sin embargo más tarde la placenta comienza a producir P_4 (a partir del día 150-250 en la vaca, 50 en la oveja, 70 en la yegua y 60-70 en la mujer) convirtiéndose en una fuente central de esta hormona para el mantenimiento de la preñez (Senger, 2003; Thomas, 2007). Recientemente Braun y col. (2012) y Siemieniuch y col. (2012) pudieron comprobar la presencia de P_4 y enzimas involucradas en la producción de dicha hormona en el tejido

placentario, hecho que confirmaría la existencia de una fuente adicional de P_4 la cual sería capaz de contribuir el mantenimiento de la gestación en la gata.

Nuestros resultados concuerdan con el estudio realizado por Nachreiner y Marple, (1974) quienes comunicaron que no se produjo aborto en ninguna de las gatas TRT con $PGF_{2\alpha}$ natural antes del día 40 de gestación. Similares resultados obtuvieron Baldwin y col. (2000) al administrar la misma droga a los 30 d de gestación comunicando que sólo 1 de las 4 gatas tratadas abortó. En contraposición Verstegen y col. (1993) al utilizar $PG F_{2\alpha}$ natural al día 33 de gestación, comunicaron que todas las gatas TRT abortaron. Así mismo la administración de CLO con CAB logró interrumpir la gestación en la totalidad de las gatas TRT al día 30 de gestación (Onclin y Verstegen, 1997). Estos resultados concuerdan con los comunicados por Erüal-Maral y col. (2004) en el cual todas las gatas TRT con CAB y alfaprostol entre los 25 y 40 d de gestación abortaron entre 6.2 ± 1.9 d de iniciado el TRT. Las diferencias encontradas en el porcentaje de interrupción de la gestación registrados entre los experimentos podrían relacionarse con la EG en la que se implementó el TRT, con las diferencias en el número de animales incluidos en cada estudio, así como también a la utilización de CAB con CLO. La acción de CAB, al disminuir la concentración de PRL sérica, evita la acción luteotrófica de esta hormona sobre el CL volviéndolo más sensible a la acción luteolítica del CLO hecho que podría explicar las diferencias entre los resultados observados entre los dos experimentos.

Todas las gatas del grupo PLA presentaron un desarrollo embrionario-fetal normal y parto eutócico, produciéndose el nacimiento de crías sanas y obteniéndose el 100% de destete. Nuestros resultados concuerdan con los comunicados por Fieni y col. (2006), quienes registraron gestaciones de 62 ± 1.2 d.

En la mayoría de los estudios en los que se administran drogas para interrumpir la gestación no se realiza un seguimiento ultrasonográfico. Si bien algunos autores utilizaron la ultrasonografía para registrar sólo la ocurrencia de la interrupción de la gestación, en ningún trabajo se comunicó un seguimiento ultrasonográfico durante el TRT, teniendo en cuenta que éste método complementario resulta de gran utilidad, ya que permite ver y monitorear a los fetos, evaluar la viabilidad y valorar el riesgo de pérdida gestacional. Los resultados obtenidos permitieron detectar cambios relacionados con interrupción media de la gestación y evaluar la ocurrencia o no de una gestación normal.

El PBF fue utilizado en mujeres gestantes de alto riesgo, permitiendo estimar y disminuir la mortalidad y morbilidad perinatal. En contraposición en nuestro trabajo el PBF no permitió identificar cambios relacionados con la interrupción de la gestación media. Las diferencias encontradas podrían estar relacionadas con el número de observaciones realizadas, ya que probablemente un seguimiento realizando observaciones con lapsos de tiempo menores entre una y otra permitiría identificar cambios relacionados a la pérdida de la viabilidad. Otro motivo podría ser el número de fetos, ya que los estudios realizados en mujeres comunican gestaciones simples de manera opuesta en nuestro trabajo la totalidad de las gatas presentaron preñeces múltiples.

Al analizar las concentraciones de P_4 de las gatas del grupo ALI pudo observarse que dichos niveles comienzan a ascender luego de iniciado el TRT, llegando a concentraciones superiores a las observadas en las gatas PLA y CLO el día 7 postratamiento. Mientras que a los 8 d del inicio del TRT, las concentraciones de P_4 retornan a las concentraciones pretratamiento, siendo las mismas semejantes a las gatas PLA y CLO. Éstos resultados concuerdan con los obtenidos en el capítulo III. En

contraposición con nuestros resultados Fieni y col. (2006) no observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de P_4 entre las gatas tratadas y controles en el periodo comprendido entre el inicio del TRT (día 33 de gestación) y 120 h postratamiento, observándose en gatas ALI concentraciones de P_4 inferiores a las controles. Las concentraciones séricas de P_4 alcanzaron concentraciones máximas a las 60 h postadministración de la droga, ocurriendo la interrupción de la gestación con niveles elevados de P_4 , mientras que 30 h postaborto se registró un descenso de la misma (Fieni y col., 2006).

De manera opuesta a los resultados obtenidos en las gatas ALI, en las hembras tratadas con CLO, se observó que la P_4 sérica descendió luego de iniciado el TRT, evidenciándose diferencias significativas al comparar las concentraciones séricas de P_4 con el grupo ALI y PLA. Los niveles de P_4 continuaron descendiendo sin llegar a concentraciones basales. Sin embargo a partir del día 4 de iniciado el TRT las concentraciones séricas de P_4 comenzaron a ascender, para alcanzar concentraciones semejantes a las gatas PLA 8 d después del inicio del TRT. El descenso de la P_4 observado inmediatamente después del TRT con CLO concuerda con los resultados obtenidos por Shille y Stabenfeldt (1979) quienes observaron una depresión de la función lútea, observando una disminución de la concentración de P_4 al administrar PGF en gatas que presentaban entre 21- 25 d de pseudopreñez. Si bien en nuestro trabajo se observó el aumento de los niveles de P_4 a los 4 d de iniciado el TRT, Shille y Stabenfeldt (1979) registraron valores basales de P_4 entre los 5 y 11 d de finalizado el TRT, lo cual podría estar relacionado con la menor resistencia del CL de la pseudopreñez. Así mismo el incremento de los niveles de P_4 y el desarrollo completo de la gestación podría estar relacionado con los hallazgos de Braun y col. (2012) y Siemieniuch y col. (2012) quienes pudieron comprobar la presencia de P_4 y enzimas

involucradas en la producción de dicha hormona en el tejido placentario, confirmando la existencia de una fuente adicional de P_4 capaz de mantener la gestación.

En concordancia con nuestros resultados, Verstegen y col, (1993) comunicaron un descenso de los niveles de P_4 en plasma a las 24 h de haber administrado $PGF_{2\alpha}$, sin embargo en su estudio todas las gatas abortaron. Resultados similares comunicaron Erüinal-Maral y col. (2004) y Onclin y Verstegen (1997) al utilizar protocolos combinados de CAB junto con PG sintética, en el cual comunicaron un descenso de las concentraciones de P_4 plasmática, y valores basales el día del aborto.

En nuestro estudio pudimos observar que durante los primeros 5 d posteriores al inicio del TRT, se produjo una reducción del 50% de la concentración de P_4 en el grupo CLO y un aumento del 53% de la concentración de P_4 en el grupo ALI comparado con el grupo PLA. Durante el periodo del día 5-7 posterior al TRT, se produjo una reducción del 42% de la concentración de P_4 en el grupo CLO y un aumento del 10% de la concentración de P_4 en el grupo ALI comparado con el grupo PLA.

En nuestro trabajo todas las gatas tratadas retornaron al estro luego del TRT. En ninguna de las hembras del grupo ALI y CLO se vio afectada la fertilidad, todas las hembras quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento, se produjo un desarrollo embrionario-fetal normal y parto eutócico. En todas las hembras felinas se produjo el nacimiento de crías sanas, obteniéndose el 100% de destete. En concordancia con nuestros resultados, Shille y Stabenfeldt (1979) comunicaron que en las gatas que habían sido tratadas con PG durante los 21-25 d de pseudopreñez, el 87.5% de las gatas quedaron preñadas y parieron crías a término. Resultados similares comunicaron Fieni y col. (2006), quienes observaron que todas las gatas tratadas retornaron al estro, un 77% quedaron preñadas en el celo posterior al aborto y un 10% en el segundo celo (Fieni y col., 2006). De manera similar la fertilidad de las gatas no se vio afectada luego del

TRT combinado con CAB y CLO (Onclin y Verstegen 1997). Sin embargo sólo el 33% de las gatas quedaron preñadas luego de utilizar un TRT combinado con CAB y alfaprostol (Erüinal-Maral y col., 2004).

Se ha demostrado que las PG sintéticas son más potentes que la PG natural. Según la potencia, la dosis recomendada para la PG sintética es menor que la PG natural, así mismo se ha observado que se reducen los efectos colaterales (Wanke y col., 2002). En nuestro trabajo las gatas tratadas con CLO presentaron los efectos colaterales comunicados en asociación a la administración de PG de intensidad leve (Wanke y col., 2002). Se ha informado que los efectos secundarios de la PG dependen de la dosis y se ha comunicado en la perra que disminuyen con la administración de dosis repetidas de la droga. Se recomienda comenzar con una dosis baja, aumentando paulatinamente hasta llegar a las dosis más altas después de 2-3 d de TRT (Verstegen y col., 2008). El mismo protocolo podría ser utilizado en gatas para reducir los efectos secundarios asociados a la administración de PG. En contraposición no se evidenciaron efectos colaterales en ninguno de los animales tratados con ALI, sin embargo en el estudio realizado por Fieni y col. (2006) un pequeño número de gatas presentó inflamación en el sitio de inyección, mientras que 4 gatas manifestaron períodos de anorexia, depresión, agitación y diarrea en los primeros 7 d de iniciado el TRT.

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que el CLO no resultó efectivo, pero el ALI si resultó efectivo para interrumpir la gestación en las gatas entre 35 y 38 d de preñez. Las gatas tratadas con ALI no presentaron efectos colaterales, en contraposición las hembras CLO presentaron efectos colaterales de grado leve.

Así mismo los datos obtenidos en los registros ultrasonográficos de las mediciones realizadas a los SG y fetos mostraron diferencias entre los grupos permitiendo detectar cambios relacionados con interrupción media de la gestación. Es así que el seguimiento ultrasonográfico durante el TRT permitió evaluar el desarrollo fetal normal o anómalo. Sin embargo el PBF no permitió identificar cambios relacionados con la interrupción de la gestación media.

Los resultados obtenidos muestran que la administración de ALI y CLO durante la gestación media en la gata permiten conservar la fertilidad postratamiento, por tal motivo dichas drogas pueden ser usadas sin poner en riesgo la salud reproductiva de los animales tratados.

CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis surge la observación de que los parámetros ultrasonográficos estudiados (DB, DSG, LON, VSG, TRV, DT, ATP, LCC, pared del SG) pueden ser utilizados para el cálculo de la EG de la gata doméstica. Este hecho queda demostrado por las altas correlaciones entre las mediciones del SG y mediciones fetales, así como los altos r^2 obtenidos de los polinomios surgidos entre el DG y mediciones del SG y entre DG y las mediciones fetales. Así mismo pudo observarse que existe una alta correlación entre el DG y la concentración sérica de P_4 , lo cual nos permite relacionar las fluctuaciones de dicha hormona con la EG. Estos hallazgos resultan de suma utilidad en la clínica reproductiva diaria en el seguimiento clínico, ultrasonográfico y endocrinológico de la gestación en la gata doméstica.

Los estudios de interrupción de la gestación demostraron que el uso de CLO no resultó efectivo, pero el ALI sí resultó efectivo para interrumpir la preñez en gatas que presentaban entre 21-22 y 35-38 d de gestación. Las gatas tratadas con CLO presentaron leves efectos colaterales con posterioridad a la administración de dicha droga, en contraposición con las gatas tratadas con ALI que no presentaron efectos colaterales. El seguimiento ultrasonográfico durante el TRT brindó la posibilidad de apreciar cambios en la morfología de los SG y fetos, lo que permitió estimar la viabilidad embrionaria-fetal y valorar el riesgo de pérdida gestacional. Los mencionados hallazgos permitieron evaluar la ocurrencia o no de una gestación normal y detectar cambios relacionados con interrupción temprana y media de la gestación. Así mismo pudo observarse que el ALI y CLO permiten conservar la fertilidad postratamiento, por tal motivo dichas drogas pueden ser usadas sin poner en riesgo la salud reproductiva de los animales tratados. Los datos obtenidos muestran que cambios ultrasonográficos del SG y de los fetos

permitirían estimar en forma temprana el riesgo de pérdida gestacional en felinos. Así mismo, ambas drogas pueden ser usadas sin afectar la fertilidad posterior de la hembra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baldwin C, Evans LE, Peter AT. Evaluation of natural prostaglandin therapy for pregnancy termination in the domestic cat. *Feline Pract.* 2000; 28: 16-21.
2. Banks DR, Stabenfeldt GH. Prolactin in the cat: II Diurnal patterns and photoperiod effects. *Biol Reprod.* 1983; 28: 933-939.
3. Beccaglia M, Luvoni GC. Prediction of parturition in dogs and cats: Accuracy at different gestational ages. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47 (6): 194-196.
4. Beck KA, Baldwin CJ, Bosu WTK. Ultrasound prediction of parturition in queens. *Veterinary Radiology.* 1990; 31: 32-35.
5. Blanco A. Bases bioquímicas de la endocrinología. En Blanco A Química biológica. 8va Edición. Buenos Aires, Argentina. Ed. El Ateneo, 2007, p.397-464.
6. Braun BC, Zschockelt L, Dehnhard M, Jewgenow K. Progesterone and estradiol in cat placenta-Biosynthesis and tissue concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 132: 295-302
7. Breukelman SP, Szenci O, Beckers J, Kindahl H, Mulder E, Jonker FH, van der Weijden B, Revy D, Pogany K, Sulon J, Némedi I, Taverne MA. Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F2alpha-metabolite (PGF2alpha-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. *Theriogenology.* 2005; 64 (4): 917-33.
8. Bruce EE. Pregnancy Termination in the Bitch and Queen. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2002; 17 (3): 116-123.
9. Colby ED. The estrous cycle and pregnancy. En: Morrow DA, editor. *Current threrapy in theriogenology.* Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1980, p. 832-839.
10. Concanon PW, Yeager A, Frank D, Iyampillai A. Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogesterone, mifepristone, in dogs, *J Reprod Fertil.* 1990; 88: 99-104.
11. Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Cloprostenol in equine reproductive practice: something more than a luteolytic drug. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45(5): 8-11.
12. Cunningham JG, Klein BG. Control de la ovulación y cuerpo lúteo. En: *Fisiología veterinaria.* 4ta Edición. Barcelona, España. Ed. Elsevier, 2009, p. 484-493.
13. Davidson A, Nyland T, Tsutsui T. Pregnancy diagnosis with ultrasound in the domestic cat. *Veterinary Radiology,* 1986; 27 (4): 109-114.
14. Erünal-Maral N, Aslan S, Findik M, Yüksel N, Handler J, Arbeiter K. Induction of abortion in queens by administration of cabergolina (Galastop) soley or in combination with the PGF2alfa analogue Alfaprostol (Gabbrostim). *Theriogenology.* 2004; 61: 1471-1475.
15. Esteve PA. Frottis vaginaux chez la chatte. Les indispensables de L'animal de compagne. P.M.C.A.C. Paris, 1992, p. 59-65.
16. Feldman EC, Nelson RW. Reproducción de gatos. En: Feldman EC, Nelson RW. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos.* 2da Edición, México, Mc Graw-Hill Interamericana, 2000, p. 806-836.
17. Ferreiro RM. Perfil biofísico: una prueba de bienestar fetal. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 1999; 25(2):77-82.
18. Fieni F, Dumon C, Tainturier D, Bruyas JF. Clinical protocol for pregnancy termination in bitches using prostaglandin F2alpha. *J Reprod Fertil.* 1997; 51:245-250.

19. Fieni F, Fuhrer M, Tainturier D. Use of cloprostenol for pregnancy termination in dogs. *J Reprod Fertil*. 1989; 39: 332-333.
20. Fiéni F, Martal J, Marnet PG, Siliart B, Bernard F, Riou M. Hormonal variation after early or mid-pregnancy termination in bitches with aglepristone (RU534), *J Reprod Fertil*. 2001; 57: 243-248.
21. Fiéni F, Martal J, Marnet PG, Siliart B, Guittot F. Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone. *Theriogenology*. 2006; 66: 1721-1728.
22. Fiéni F, Tainturier D, Bruyas JF, Badinand F, Berthelot X, Ronsin P, Rachail M, Lefay M.P. Etude clinique d'une anti-hormone pour provoquer l'avortement chez la chienne: l'aglepristone, *Rec Med Vet*. 1996; 172: 359-367.
23. Forsberg FL, Kindahl H, Madej A. Termination of mid-term pregnancy in the dog with oral RU 486, *J Small Anim Practice*. 1992; 33: 331-336.
24. Galac S, Kooistra HS, Butinar J, Bevers MM, Dieleman SJ, Voothout G. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist, *Theriogenology*. 2000; 53: 941-950.
25. García Mitacek MC, Praderio RG, Bonauro MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Relación entre parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata doméstica. *Analecta Veterinaria*. 2013; 32 (2): 5-10.
26. García Sacristan ACM, de la Cruz Palomino F, González Gallego LF, Murillo López de Silanes J. *Fisiología Veterinaria*. McGraw-Hill, Madrid, 1995, p. 969-986.
27. Georgiev P, Bostedt H, Goericke-Pesch S, Dimitrov M, Petkov P, Stojanthev K, Tsoneva V, Wehrend A. Induction of abortion with aglepristone in cats on day 45 and 46 after mating. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45(5):161-167.
28. Georgiev P, Wehrend A. Histological changes of the feline cervix, endometrium and placenta after mid-gestacional termination of pregnancy with aglepristone. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43(4): 409-414.
29. Georgiev P, Wehrend A. Mid-gestation pregnancy termination by the progesterone antagonist aglepristone in queens. *Theriogenology*. 2006; 65(7): 1401-1406.
30. Gimenez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Videla Dorna I, de la Sota RL, Stornelli MA. Suppression of estrus in cats with melatonin implants. *Theriogenology*. 2009; 72(4):493-499.
31. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Wehrend A. Prevention of pregnancy in cats using aglepristone on days 5 and 6 after mating. *Theriogenology*. 2010; 74(2): 304-310.
32. Hoffman B, Schuler G. Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60-61: 295-312.
33. Huaman M, Pacheco J, Rosales H, Arias L. Perfil biofísico ecográfico (PBE) en vigilancia fetal. *Ginecol Obstet*. 1995; 41 (1): 52-5
34. Illanes J, Orellana C, Fertilio B; Leyton V, Venegas F. Análisis Macroscópico y Microscópico del desarrollo embrionario y fetal en el gato (*Felis catus*), en relación con el desarrollo de la vesícula coriónica y de la placenta. *Int J Morphol*. 2007; 25(3): 467-481.
35. Jackson W, Johnston SD. Pregnancy prevention and termination. En: Kirk RW, *Current veterinary therapy VII. Small animal practice*, WB Saunders Co., 1980, p. 1239-1241.
36. Jemmett JE, Evans JM. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *J Small Anim Pract*. 1977; 18: 31-37.

37. Johnson CA, Anormalidades del ciclo estral. En Nelson RW, Couto GC, editores. Medicina interna de animales pequeños. 2da Edición. Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter.-Médica, 2000, p. 891-917.
38. Jöchle M, Jöchle W. Interruption of pregnancies in the queen with a prolactin inhibitor, cabergoline. Riv Zootecln Veterin. 1998; 16: 85-88.
39. Jöchle W, Arbeiter K, Post K, Ballabio R, D'Ver SA. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 199-207.
40. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. The queen. En: Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company, 2001; p. 389-495.
41. Keats TE, Siström, C. Atlas de mediciones radiológicas. 7ma Edición. Ed. Mosby-doyma. Vol. 1, 2002, p. 526-566.
42. Knospe C. Periods and Stages of the Prenatal Development of the Domestic Cat. Anat. Histol. Embryol. 2002; 31: 37-51.
43. Kronfeld DS, Donoghue S, Glickman LT. Body condition of cats. J Nutr 124. 1994; 12: 2683S-2684S.
44. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 125-133.
45. Malassine A, Ferre F. 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in placental labyrinth: evolution during pregnancy, subcellular distribution. Biol Reprod. 1979; 21: 965-971.
46. Manning FA, Morrison I, Harman CR, Lange IR, Menticoglou S. Fetal assessment based on fetal biophysical profile scoring: experience in 19,221 referred high-risk pregnancies. II. An analysis of false-negative fetal deaths. Am J Obstet Gynecol. 1987; 157: p. 880-884.
47. Manning FA. Fetal biophysical profile score: Theoretical considerations and practical application. En: Fleischer AC. Sonography in Obstetrics & Gynecology. Principles and Practice. 7th Edition. New York, USA. Ed. McGraw-Hill Companies. 2010; 705-713.
48. Martins JP, Policelli RK, Pursley JR. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. J Dairy Sci. 2011; 94(6): 2806-14.
49. McDonald's. Female reproductive system. En Pineda MH, McDonald's Veterinary endocrinology and reproduction. 5th Edition. Iowa, USA. Ed. Iowa State Press. 2003, p. 283-340.
50. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. Can Vet J. 1979; 20 (4): 95-101.
51. Munday HS, Davidson HPB. Normal gestation lengths in the domestic shorthair cat (felis domesticus) J Reprod Fertil. 1993; 47: 559.
52. Nachreiner RF, Marple DN. Termination of pregnancy in cats with prostaglandin F2alfa. Prostaglandins. 1974; 7: 303-308.
53. Nagy P, Solti L, Kulcsár M, Reiczigel J, Huszenicza G, Abaváry K, Wölfling A. Progesterone determination in equine plasma using different immunoassays. Acta Vet Hung. 1998; 46(4):501-513.
54. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2da. Edición. México. Ed Lomelí, C. Estampa de artes gráficas, 2002.

55. Nelson RW, Couto G. Medicina interna de los animales domésticos. 2da. Edición. Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica, 2000, p. 936-953.
56. Nuñez Favre R, Giménez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, de la Sota RL, Stornelli MA. Induction of abortion in queens by administration of aglepristone (Alizin[®]): preliminary results. *Theriogenology*. 2007; 68: 499-500.
57. Nyland TG, Mattoon JS. Ovarios y útero. En Nyland TG, Mattoon JS. Diagnóstico ecográfico en pequeños animales. 2da. Edición, Barcelona, España. Ed. W.B.S. Company, 2002, p. 240-259.
58. Onclin K, Verstegen J. Termination of pregnancy in cats using a combination of cabergoline, a new dopamine agonist, and a synthetic PGF2 alpha, cloprostenol. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997; 51: 259-263.
59. Onclin K, Verstegen JP. Practical use of a combination of a dopamine agonist and a synthetic prostaglandin analogue to terminate unwanted pregnancy in dogs, *J Small Anim Pract*. 1996; 37: 211-216.
60. Petersen RG. Design and Analysis of Experiments. Marcel Dekker, Inc. New York, 1985, p. 429.
61. Povey R. Reproduction in the pedigree female cat. A survey of breeders. *Can Vet J* 1978; 19: 207-213.
62. Prescott CW. Reproduction, patterns in the domestic cat. *Aust Vet J*. 1973; 49: 126-127.
63. Pretzer SD. Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*. 2008; 70: 300-303.
64. Robledo MAM, Carneiro M, Raratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J, Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003; 27(2): 274-275.
65. Romagnoli S. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. IVIS website with the permission of WSAVA. [Online] <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture24/romagnoli4.pdf>, 2006; p.701-706.
66. Rott MV, Johnston SD, Olson PN. Estrous length, pregnancy rate gestation and parturition lengths, litter size and juvenile mortality in the domestic cat. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1995; 31: 429-433.
67. SAS[®]. SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2003.
68. Schmidt PM, Chakraborty PK, Wildt DE. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. *Biol Reprod*. 1983; 28: 657-671.
69. Scott PP. Cats in reproduction and breeding. En: Hafez ESE, editor. *Techniques for laboratory animals*. Philadelphia, Lea & Febiger. 1970, p 208.
70. Senger PL. Placentation, the endocrinology of gestation and parturition. En Senger PL *Pathways to pregnancy and parturition*. 2nd Edition. Washington, USA. Current Conception, INC, 2003, p. 304-325
71. Shille VM, Stabenfeldt GH. Luteal function in domestic cat during pseudopregnancy after treatment with prostaglandin F2 α . *Biol Reprod*. 1979; 21: 1217-1223.
72. Siemieniuch MJ, Jursza E, Szostek AZ, Skarzynski DJ, Boos A, Kowalewski MP. Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10: 89.

73. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation Mechanisms: Insights the Sheep. *Reproduction*. 2004; 128: 657-668.
74. Spitz IM, Croxatto HB, Robbins A. Antiprogestins: mechanism of action and contraceptive potential. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996; 36: 47-81.
75. Stornelli MA. Physiological aspects of feline reproduction. *Braz J Anim Reprod*. 2007; 31 (1): 71-76.
76. Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. In Vivo Embryogenesis, Embryo Migration, and Embryonic Mortality in the Domestic Cat. *Biol Reprod*. 1994; 51: 452-464
77. Swanson WF, Roth TL, Brown JL, Wildt DE. Relationship of circulating steroid hormones, luteal luteinizing hormone receptor and progesterone concentration, and embryonic mortality during early embryogenesis in the Domestic Cat. *Biol Reprod*. 1995; 53: 1022-1029.
78. Systat. Sigmaplot User's Guide, version 10.0. Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA, 2006.
79. Thomas PGA. Induced abortion. En Youngquist RS, Threlfall W Current therapy in large animal theriogenology. 2nd Edition. St. Louis, Missouri, USA. Ed. Elsevier Inc, 2007, p. 307-310.
80. Tsutsui T, Nakagawa K, Hirano T, Nagakubo K, Shinomiya M, Yamamoto K, Hori T. Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. *J Vet Med Sci*. 2004; 66: 1129-1132.
81. Tsutsui T, Suzuki Y, Toyonaga M, Oba H, Mizutani T, Hori T. The role of the ovary for the maintenance of pregnancy in cats. *Reprod Dom Anim*. 2009; 44, (2) 120-124.
82. Verhage HG, Beamer NB, Brenner. RM. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod*. 1976; 14: 579-585.
83. Verstegen J, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*. 2008; 364-374.
84. Verstegen J, Onclin K, Silva LD, Wouters-Ballman P, Delahaut P, Ectors F. Regulation of progesterone during pregnancy in the cat: studies on the roles of corpora lutea, placenta and prolactin secretion, *J Reprod Fertil Suppl*. 1997; 7: 165-173.
85. Verstegen J, Onclin K, Silva LDM, Wouters-Ballmann P, Donnay I, Delahaut P, Ectors F. Induction of abortion in bitches and cats by cabergoline. *Ann Med Vet*. 1993; 137: 251-259.
86. Verstegen J. Reproducción felina. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. Tratado de medicina interna veterinaria. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica, 2002, p. 1764-1780.
87. Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Donnay I. Abortion induction in the cat using prostaglandin F2 alpha and a new anti-prolactinic agent, cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl*. 1993; 47: 411-417.
88. Verstegen JP. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. En Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. United Kingdom, British Association, 1998, p. 11-16.
89. Wanke MM, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon PW. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists, and dexamethasone. [Online]

- <http://www.ivis.org/advances/concannon/wanke/ivis.pdf>. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2002.
90. Wildt DE, Seager SW, Chakraborty PK. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*. 1980; 107: 1212-1217.
 91. Zambelli D, Castagnetti C, Belluzzi S, Bassi S. Correlation between the age of the conceptus and various ultrasonographic measurements during the first 30 days of pregnancy in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2002; 57: 1981–1987.
 92. Zambelli D, Castagnetti C, Belluzzi S, Paladini C. Correlation between fetal age and ultrasonographic measurements during the second half of pregnancy in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2004; 67: 1430–1437.
 93. Zambelli D, Prati F. Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens. *Theriogenology*. 2006; 66(1): 135-44.

APÉNDICE I

Valores esperados a partir de las ecuaciones de regresión múltiple de los parámetros del saco gestacional evaluados durante el seguimiento ultrasonográficos del día 21 al 63 de gestación.

Parámetros ultrasonográficos del saco gestacional						
DG ⁽¹⁾	LON ⁽²⁾	ATP ⁽³⁾	TRV ⁽⁴⁾	VSG ⁽⁵⁾	DSG ⁽⁶⁾	Pared del SG ⁽⁷⁾
21	15.97	13.77	15.61	1022.24	15.19	2.38
22	18.60	14.46	17.04	1248.41	16.77	2.52
23	21.16	15.15	18.43	2541.88	18.30	2.66
24	23.66	15.81	19.79	3835.36	19.80	2.79
25	26.09	16.46	21.09	5128.84	21.26	2.92
26	28.46	17.10	22.36	6422.32	22.68	3.05
27	30.76	17.73	23.59	7715.80	24.05	3.17
28	33.00	18.34	24.77	9009.28	25.39	3.28
29	35.17	18.93	25.92	10302.75	26.69	3.39
30	37.28	19.52	27.02	11596.23	27.95	3.49
31	39.32	20.08	28.08	12889.71	29.17	3.59
32	41.29	20.64	29.10	14183.19	30.35	3.69
33	43.20	21.18	30.08	15476.67	31.49	3.78
34	45.04	21.70	31.01	16770.15	32.59	3.86
35	46.82	22.21	31.91	18063.63	33.66	3.94
36	48.54	22.71	32.76	19357.10	34.68	4.02
37	50.18	23.20	33.57	20650.58	35.66	4.09
38	51.77	23.66	34.35	21944.06	36.60	4.15
39	53.28	24.12	35.07	23237.54	37.51	4.21
40	54.73	24.56	35.76	24531.02	38.37	4.27
41	56.12	24.99	36.41	25824.50	39.19	4.32
42	57.44	25.40	37.01	27117.98	39.98	4.37
43	58.70	25.80	37.58	28411.45	40.72	4.41
44	59.89	26.19	38.10	29704.93	41.43	4.44
45	61.01	26.56	38.58	30998.41	42.09	4.48
46	62.07	26.91	39.02	32291.89	42.72	4.50
47	63.06	27.26	39.42	33585.37	43.30	4.52
48	63.99	27.58	39.78	34878.85	43.85	4.54
49	64.86	27.90	40.09	36172.32	44.36	4.55
50	65.65	28.20	40.37	37465.80	44.83	4.56
51	66.39	28.49	40.60	38759.28	45.25	4.56
52	67.05	28.76	40.79	40052.76	45.64	4.56
53	67.65	29.02	40.94	41346.24	45.99	4.56
54	68.19	29.26	41.05	42639.72	46.30	4.54
55	68.66	29.49	41.12	43933.20	46.57	4.53
56	69.07	29.71	41.14	45226.67	46.80	4.51
57	69.41	29.91	41.13	46520.15	46.99	4.48
58	69.68	30.10	41.07	47813.63	47.14	4.45
59	69.89	30.27	40.97	49107.11	47.25	4.41
60	70.03	30.43	40.83	50400.59	47.32	4.37
61	70.11	30.58	40.65	51694.07	47.35	4.33
62	70.12	30.71	40.43	52987.55	47.35	4.28
63	70.07	30.82	40.16	54281.02	47.30	4.22

⁽¹⁾DG: Día de gestación, ⁽²⁾LON: Longitudinal, ⁽³⁾ATP: Anteroposterior, ⁽⁴⁾TRV: Transversal, ⁽⁵⁾VSG: Volumen del Saco Gestacional, ⁽⁶⁾DSG: Diámetro del Saco Gestacional, ⁽⁷⁾Pared del SG: Pared del Saco gestacional

Valores esperados a partir de las ecuaciones de regresión múltiple de los parámetros fetales evaluados durante el seguimiento ultrasonográficos del día 35 al 63 de gestación.

Parámetros ultrasonográficos fetales			
DG ⁽¹⁾	LCC ⁽²⁾	DB ⁽³⁾	DT ⁽⁴⁾
35	31.70	10.07	11.33
36	33.57	10.53	12.49
37	35.38	10.98	13.61
38	37.13	11.43	14.71
39	38.82	11.89	15.78
40	40.45	12.34	16.82
41	42.03	12.80	17.83
42	43.54	13.25	18.81
43	45.00	13.70	19.76
44	46.39	14.16	20.69
45	47.73	14.61	21.59
46	49.01	15.07	22.46
47	50.22	15.52	23.30
48	51.38	15.97	24.11
49	52.48	16.43	24.89
50	53.52	16.88	25.65
51	54.50	17.34	26.38
52	55.43	17.79	27.08
53	56.29	18.24	27.75
54	57.09	18.70	28.39
55	57.84	19.15	29.00
56	58.52	19.60	29.59
57	59.15	20.06	30.14
58	59.72	20.51	30.67
59	60.22	20.97	31.17
60	60.67	21.42	31.64
61	61.06	21.87	32.09
62	61.39	22.33	32.50
63	61.66	22.78	32.89

⁽¹⁾DG: Día de gestación, ⁽²⁾LCC: Longitud cráneo-caudal, ⁽³⁾DB: Diámetro Biparietal, ⁽⁴⁾DT: Diámetro Transverso abdominal.

BIOGRAFÍA PERSONAL

La Médica Veterinaria María Carla García Mitacek nació en la ciudad de La Plata el 19 de Octubre de 1983. Realizó sus estudios de Educación General Básica y Polimodal en el Colegio Nuestra Señora del Pilar de la ciudad de La Plata. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP en Febrero de 2002 y obtuvo el título de Médica Veterinaria en Agosto de 2007. Recibió la distinción de Mejor Promedio de la Promoción 2006 de Médicos Veterinarios de la FCV UNLP.

En el año 2007 ingresó como Ayudante Alumna *ad honorem* en la Cátedra y Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales, y luego a partir de su graduación pasó a ser Ayudante Diplomado *ad honorem*. Actualmente se desempeña como Ayudante Diplomado Interino en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal.

En el año 2007 fue becada por concurso de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires- CIC para comenzar a dar sus primeros pasos en la investigación a través de una Beca de Entrenamiento. Más tarde se le otorgó una Beca de Estudio de la CIC para comenzar sus estudios de postgrado los cuales pudo continuar con la obtención de una Beca de Perfeccionamiento de la CIC y una Beca Postgrado Tipo II del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas- CONICET para realizar su trabajo de tesis doctoral.

Reconociendo la imperiosa necesidad de la especialización, la mencionada profesional, en el año 2007 comenzó a trabajar en el área de Reproducción de Pequeños Animales, área en la que desde entonces ha desarrollado tareas dictando numerosos cursos a profesionales y publicando varios trabajos científicos y divulgación técnica.

En 2008, comenzó a desarrollar su actividad en investigación como Docente Investigadora del Programa de Incentivos, y más tarde, en 2009, comenzó a desarrollar su Tesis Doctoral en ésta Facultad bajo la dirección de la Doctora Williams Sara Inés y Codirectora Stornelli María Alejandra en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal.

En 2012 obtuvo la beca Latin America Laboratory Animal Science Training Fellowship Program otorgada por el Massachusetts General Hospital, Center for Comparative Medicine, la cual le permitió realizar un entrenamiento sobre el uso y cuidados de animales de laboratorio.

Una vez finalizada ésta tesis, continuará con su labor de docencia e investigación sobre el control de la reproducción en pequeños animales en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales.